

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

ESTUDO DO DESEMPENHO E DA
COMUNIDADE MICROBIANA DE
BIORREACTORES TRATANDO EFLUENTE
ANAERÓBIO CONTENDO SULFETO

Graziella Patrício Pereira Garcia

Belo Horizonte

2014

**ESTUDO DO DESEMPENHO E DA
COMUNIDADE MICROBIANA DE
BIORREATORES TRATANDO EFLUENTE
ANAERÓBIO CONTENDO SULFETO**

Graziella Patrício Pereira Garcia

Graziella Patrício Pereira Garcia

**ESTUDO DO DESEMPENHO E DA
COMUNIDADE MICROBIANA DE
BIORREATORES TRATANDO EFLUENTE
ANAERÓBIO CONTENDO SULFETO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito ao título de Doutor em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

Orientador: Prof^a Juliana Calábria de Araújo

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2014

“Reconhece o Senhor em todos os teus caminhos, e Ele endireitará as tuas veredas”.
Provérbios 3:6

Dedico à minha amada mãe Margery, por ter me ensinado a amar a instrução e o conhecimento e buscá-los como um tesouro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela presença constante e Seu amor incondicional; por ter me dado inteligência e capacidade para apreciar a vida! Por colocar no meu caminho, pessoas que colaborassem nesta importante etapa! Obrigada por permitir que eu veja nos pequenos detalhes, sejam estes microscópicos, a grandeza da sua criação!

À minha amada mãe guerreira Margery, que merece ser honrada por ser a mulher mais virtuosa que conheço, além de dar exemplo de perseverança e integridade! Ao meu amado pai Walter, pelo apoio e incentivo! Queridos pais, muito obrigada por acreditarem que eu “vou chegar lá!”

Ao meu precioso marido Carlos, pelo companheirismo em todos os momentos... Obrigada por me amar e por ter despertado em meu coração, este sentimento! Obrigada por estar sempre ao meu lado e acreditar que posso alcançar os degraus mais altos! Aos meus sogros, pelo carinho e incentivo!

Às minhas irmãs Gláucia e Renata, pela camaradagem e porque juntas somos como o carvalho, permanecemos firmes apesar das tempestades! Ao meu cunhado, quase irmão Kleber, pela força! Aos meus doces sobrinhos Débora, Walter e Ana Lídia, por mostrarem que a vida é curta demais e, por isso, deve ser vivida intensamente! Ao meu afilhadinho João, por me fazer rir em momentos difíceis!

Aos meus pastores Fernando e Maria Tereza pelo amor, amizade e apoio em todos os momentos da minha vida! Aos queridos membros e amigos da Igreja do Nazareno do bairro Caiçara pelas orações e pelo carinho!

Aos meus queridos orientadores Dr^a Juliana e Dr. Carlos, pela oportunidade e pelo apoio na pesquisa! Muito obrigada por estarem sempre disponíveis e realizarem a orientação desse trabalho com comprometimento.

Aos professores Léo Heller, Sílvia, Sonaly e Lisete pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas do programa.

A minha querida amiga e companheira Ana Maria, pelo apoio e amizade em todo o tempo! A minha amiga Carol, por estar sempre presente na minha vida!

Aos colaboradores e amigos Rê, Vitinho, Sarinha, Aninha, Kênia, Merly, Eider, Rodrigo, Alice e Daniel! Obrigada por dedicarem e se importarem com cada etapa deste trabalho, juntos somos vitoriosos!

Aos meus companheiros e amigos de laboratório Cíntia, Lu, Eriquita, Alessandra, Karol, Alyne, Cris, Aracele, Marcela, Guilherme, Breno, Isabella, Thais e Lívia. Agradeço a todos vocês pela ajuda e maravilhoso convívio!

Aos colegas prof Cláudio, prof César, André, Paulo Gustavo, Emanuel, Marcela, Júlia, Lívia, Kátia e Luiz Felipe, pela valiosa contribuição nos seminários direcionados pelo prof Carlos.

As funcionárias, Cláudia e Iara, pela disposição em ajudar!

Ao CNPq pela bolsa concedida e pela taxa de bancada, importante apoio financeiro neste projeto e a FINEP pelo financiamento do projeto.

Ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, pela oportunidade!

RESUMO

A proposta do estudo foi tratar o efluente do reator UASB em dois reatores, com intuito de promover a oxidação biológica do sulfeto dissolvido a enxofre elementar. Os reatores foram operados durante dezessete meses e as condições operacionais testadas foram três tempos de detenção hidráulica, 24h, 12h e 6h, respectivamente, e dois tipos de materiais suportes, anéis plásticos e biobob. Os resultados demonstraram maior eficiência de remoção de sulfeto nos dois reatores quando operados com TDH de 12h, cuja eficiência média foi de 90%. Além disso, os resultados mostraram que a formação de enxofre elementar, proveniente da oxidação do sulfeto, ocorreu nos dois reatores nas diferentes condições operacionais testadas e, especificamente no TDH de 24h, o reator contendo meio suporte apresentou maiores concentrações de enxofre no efluente, biofilme e lodo, quando comparado com o reator sem meio suporte e contendo biobob. No que se refere a presença de bactérias envolvidas na oxidação biológica de sulfeto nos dois reatores, as sulfobactérias púrpuras e verdes foram detectadas tanto pelo DGGE quanto pela técnica de pirosequenciamento-454 e os resultados de microscopia óptica apresentaram a predominância de colônias de sulfobactérias púrpuras similar a *Chromatium* sp. Os resultados de pirosequenciamento mostraram que o reator 1 (com anel plástico) operado nos TDH de 24 e 12h apresentou maior abundância relativa de bactérias sulfurosas quando comparado com o reator 2. Este reator por sua vez, na condição sem meio suporte e no TDH de 12h apresentou maior abundância de bactérias não-sulfurosas. Portanto, o meio suporte anel plástico propiciou maior desenvolvimento de bactérias sulfurosas, quando comparado com o reator sem meio suporte e com biobob. Além disso, a melhor condição operacional para promover a recuperação de enxofre elementar foi observada no R1 no TDH de 24h, com anéis plásticos como meio suporte. Este trabalho mostrou que a configuração dos reatores, similar a um decantador de um reator UASB, pode ser usada para promover a remoção de sulfeto dissolvido do efluente de reatores anaeróbios, tratando esgotos sanitários.

ABSTRACT

The study proposal was treating UASB reactor effluent in two reactors, aiming to promote the biological oxidation of dissolved sulfide to elemental sulfur. The reactors were operated for seventeen months and the operating conditions were tested three hydraulic retention times, 24h, 12h and 6h, respectively, and two types of media materials, plastic rings and biobob. The results showed higher efficiency of sulfide removal in both reactors when operated with HRT of 12h, whose average efficiency was 90%. Moreover, the results showed that the formation of elemental sulfur from oxidation of sulfide occurred in two reactors operating at different conditions tested, and specifically in HRT of 24 hours, the reactor containing support media showed higher sulfur concentrations in effluent, biofilm and sludge as compared with the reactor containing biobob and without supporting material. As regards the presence of bacteria involved in the biological oxidation of sulphide in the two reactors, the purple and green sulfur bacteria were detected both by DGGE technique as by pyrosequencing-454 and the results from optical microscopy showed the predominance of similar purple colonies sulfur bacteria *Chromatium* sp. The pyrosequencing results showed that the reactor 1 (with plastic ring) operated at 24 and 12 hours HRT higher relative abundance of sulfur bacteria compared to reactor 2. This reactor in turn, provided without supporting material and the HRT of 12h showed the highest number of non-sulfur bacteria. Therefore, the plastic support ring provided further development of sulfur bacteria, when compared with the reactor without support and with biobob. Moreover, the best operating condition for promoting the recovery of elemental sulfur was observed in the HRT of R1 24h with plastic rings. This work showed that the configuration of the reactors, designed with a shape that resembles the settler compartment of an UASB reactor, can be used to promote the removal of dissolved sulfide effluent from anaerobic reactors treating sewage.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 CICLO DO ENXOFRE.....	3
2.2 CARACTERÍSTICAS DO ÍON SULFATO	5
2.2.1 <i>Redução Assimilatória do Sulfato</i>	6
2.2.2 <i>Redução Desassimilatória do sulfato</i>	6
2.3 CARACTERÍSTICAS DO ÍON SULFETO	7
2.4 PROBLEMAS RELACIONADOS COM FORMAÇÃO DE SULFETOS EM SISTEMAS ANAERÓBIOS.....	9
2.5 PROCESSOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE SULFETO EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS	11
2.6 OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DE SULFETO A ENXOFRE ELEMENTAR	13
2.6.1 <i>Oxidação aeróbia de sulfeto por bactérias incolores</i>	16
2.6.2 <i>Oxidação anaeróbia de sulfeto por sulfobactérias verdes e púrpuras</i>	19
2.6.3 <i>Mecanismos e enzimas envolvidas na oxidação biológica de sulfeto em quimiolitotróficas</i>	22
2.6.4 <i>Mecanismos e enzimas envolvidas na oxidação biológica de sulfeto em sulfobactérias verdes e púrpuras</i>	23
2.6.5 <i>Oxidação biológica e química do enxofre elementar</i>	26
2.6.6 <i>Remoção biológica de sulfeto de hidrogênio em reatores</i>	28
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4 HIPÓTESES.....	33
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 APARATO E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	34
5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	38
5.2.1 <i>Sulfeto</i>	39
5.2.2 <i>Sulfato</i>	40
5.2.3 <i>Tiosulfato</i>	40
5.2.4 <i>Enxofre elementar</i>	41
5.2.5 <i>Série de sólidos, pH e potencial redox</i>	41
5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	41
5.3.1 <i>Análises microscópicas: Microscopia comum e eletrônica de varredura (MEV) com EDX da biomassa dos reatores</i>	41
5.3.2 <i>Extração de DNA</i>	42
5.3.3 <i>Reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel de gradiente desnaturante</i>	43
5.3.4 <i>Pirosequenciamento</i>	46
6 RESULTADOS	47
6.1 DESEMPENHO DOS REATORES DE OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DE SULFETO	47
6.1.1 <i>Relação entre pH e potencial redox do afluente e do efluente dos reatores</i>	47
6.1.2 <i>Monitoramento das concentrações de sulfeto, sulfato, tiosulfato e enxofre elementar dos pontos afluente e efluente dos reatores</i>	50
6.1.3 <i>Balço de distribuição de enxofre elementar no lodo, biofilme e efluente dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais</i>	55
6.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DOS REATORES NAS DIFERENTES FASES OPERACIONAIS ...	61
6.2.1 <i>Análise de microscopia eletrônica de varredura com EDX das amostras dos reatores</i>	61
6.2.2 <i>Análise por microscopia óptica dos micro-organismos presentes nos reatores</i>	62
6.2.1 <i>Caracterização da comunidade bacteriana pela análise de PCR-DGGE da espuma do decantador do reator UASB</i>	64

6.2.2	<i>Caracterização da comunidade bacteriana pela análise de PCR-DGGE do R1 e R2.</i>	67
6.2.3	<i>Comparação do perfil de bandas da comunidade bacteriana de cada reator.</i>	72
6.2.4	<i>Análise da composição da comunidade microbiana pela técnica de pirosequenciamento- 454.</i>	76
6.2.5	<i>Caracterização da comunidade microbiana pela análise de pirosequenciamento</i>	80
6.2.6	<i>Gêneros de bactérias sulfurosas e não sulfurosas presentes nos reatores R1 e R2, nos tempos de detenção hidráulica de 24h e 12h.</i>	91
6.2.7	<i>Gêneros de bactérias redutoras de sulfato</i>	100
6.2.8	<i>Resumo dos resultados obtidos e possíveis metabolismos encontrados nos reatores</i>	101
7	CONCLUSÕES	104
8	RECOMENDAÇÕES	105
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
10	APÊNDICE	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Ciclo global do enxofre.....	4
Figura 2.2 - Representação esquemática do ciclo biológico do enxofre.	5
Figura 2.3 - Bioquímica da redução desassimilativa do íon sulfato.....	7
Figura 2.4 - Distribuição percentual das espécies de sulfeto em meio aquoso para diferentes valores de pH, para a temperatura de 25°C.	8
Figura 2.5 - Toxicidade do sulfeto de hidrogênio.	10
Figura 2.6 - Processos químicos e biológicos para controle da emissão de H ₂ S.....	12
Figura 2.7 - Ciclo do enxofre e seus estados de oxidação.....	15
Figura 2.8 - Bioquímica da oxidação de sulfeto por bactérias quimiolitotróficas.....	23
Figura 2.9 - Fluxo de elétrons na fotossíntese anoxigênica em bactérias sulfurosas púrpuras.....	24
Figura 2.10 - Membrana fotossintética em sulfobactérias púrpuras.....	25
Figura 2.11 - Comparação do fluxo de elétrons entre as bactérias sulfurosas púrpuras e verdes	26
Figura 5.1 - Imagem do aparato experimental usado nesse estudo constituído pelo reator UASB em escala piloto e por dois reatores destinados a remoção biológica de sulfeto (R1 e R2).	35
Figura 5.2 - Desenho esquemático (a) e fotografia (b) do aparato experimental. Os componentes dos reatores estão numerados: (1) mesa suporte dos reatores, (2) entrada do afluente, (3) reator (4) cesto interno para preenchimento com meio suporte (5) tampa transparente (6) saída do efluente.	36
Figura 5.3 - Imagem do meio suporte utilizado como material de enchimento nos reatores. (a) Biobob (b) Anel de polipropileno (c) e (d) biofilme formado no biobob e no anel plástico, respectivamente.	37
Figura 5.4 - Etapas da preparação das amostras para visualização no MEV.	42
Figura 6.1 - Diagrama de Pourbaix S/H ₂ O, considerando algumas espécies de enxofre em relação a faixa de pH e potencial redox do afluente e dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.	49
Figura 6.2 -Box-plot das concentrações de sulfeto (afluente e efluente) dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais.	50
Figura 6.3 - Eficiência de remoção de sulfeto no afluente e efluente dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais.	52
Figura 6.4 - Perfil das concentrações de tiosulfato no afluente e efluente dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais.....	53
Figura 6.5 - Perfil das concentrações de sulfato no afluente e efluente dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais.	53
Figura 6.6 - Box-plot das concentrações de enxofre no afluente e efluente dos reatores 1 e 2, nas três fases operacionais.....	54
Figura 6.7 - Distribuição do enxofre no lodo e no biofilme dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.....	58
Figura 6.8 - Espectrogramas do EDX e elementos químicos presentes nas amostras dos biofilmes dos reatores R1 e R2, nos TDHs de 24 e 12h e espuma do R2-24h.	61
Figura 6.9 - (a-c) Imagens da biomassa microbiana que desenvolveu durante a oxidação biológica de sulfeto nos reatores R1 e R2. (d-f) Observações microscópicas da biomassa presente nos reatores R1 e R2.....	62
Figura 6.10 - Perfil de DGGE da comunidade bacteriana presente na amostra de espuma do reator UASB.	64
Figura 6.11 - Perfil de DGGE da comunidade bacteriana presente nas amostras dos reatores R1 e R2, no TDH de 24h e 12h.	67

Figura 6.12 - Dendograma do perfil da comunidade bacteriana do DGGE dos reatores 1 e 2, nas duas diferentes fases operacionais (TDH de 24h e 12h). À direita contém os dados quanto a especificação do reator, TDH e amostra; à esquerda indica a porcentagem de similaridade e identificação dos grupos.	73
Figura 6.13 - Índice de Shannon das amostras dos reatores 1 e 2 nas duas diferentes fases operacionais (TDH de 24h e 12h).	74
Figura 6.14 - Histograma de distribuição do comprimento das sequências obtidas.....	76
Figura 6.15 - Curva de rarefação definida pela similaridade de 97% das sequências das amostras do biofilme R1-24h, espuma R2-24h , biofilme R1-12h e R2-12h, respectivamente.	78
Figura 6.16 - Dendograma baseado na análise de agrupamento do índice Bray-Curtis para as amostras dos reatores, no TDH de 12h e 24h.	79
Figura 6.17 - Abundância relativa de filo (similaridade 97%) das amostras do R1 e R2, nos TDH de 24h e 12h.	81
Figura 6.18 - Abundância relativa dos gêneros da ordem <i>Synergistales</i> (similaridade 97%) presentes nas amostras do R1 e R2, nos TDH de 24h e 12h.	85
Figura 6.19 - Abundância relativa das ordens pertencentes ao filo <i>Proteobacteria</i> , presente nos reatores.	89
Figura 6.20 - Abundância relativa dos gêneros de bactérias não sulfurosas e sulfurosas nos reatores 1 e 2, nos TDH de 24h e 12h.	92
Figura 6.21 - Foto com detalhe da camada verde externa e camada interna púrpura (indicado pela seta) na espuma do R2-24h.	93
Figura 6.22 - Somatório dos gêneros presentes nos reatores em função dos possíveis metabolismos que podem ter sido realizados nos reatores.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Efeitos da formação de sulfeto em reatores anaeróbios.	9
Tabela 2.2 - Caracterização de reatores biológicos utilizados para remoção de sulfeto.	32
Tabela 5.1 - Composição do esgoto bruto e do efluente anaeróbio proveniente do reator UASB.	35
Tabela 5.2 - Características dos principais componentes dos reatores R1 e R2.....	36
Tabela 5.3 - Fases operacionais e características dos reatores.	37
Tabela 5.4 - Parâmetros, métodos analíticos, frequência e pontos de amostragem.	39
Tabela 5.5 - Principais características do par de iniciadores usado na PCR-DGGE.....	43
Tabela 5.6 - Descrição do programa usado no termociclador para as reações de amplificação do gene RNAr 16S com o par de iniciadores 1055F-1392R.	44
Tabela 5.7 - Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR.	44
Tabela 5.8 - Barcode de referências das amostras dos reatores 1 e 2, nos TDH de 24h e 12h.	46
Tabela 6.1 - Valores médios de pH e potencial redox do afluente e efluente dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.	48
Tabela 6.2 - Massa de STV e enxofre elementar das amostras de lodo e biofilme acumulado durante três meses de operação dos reatores.	56
Tabela 6.3 - Posição taxonômica das bandas de DDGE obtidas da amostra de espuma do reator UASB de acordo com RDP Classifier em um nível de confiança de 80% e as sequências mais próximas obtidas no GenBank relacionadas ao gene 16S rRNA, e a porcentagem de similaridade é apresentada por meio da ferramenta BLAST.	65
Tabela 6.4 - Posição taxonômica das bandas de DDGE obtidas das amostras dos R1 e R2, no TDH de 24h e 12h, de acordo com RDP Classifier em um nível de confiança de 80% e as sequências mais próximas obtidas no GenBank relacionadas ao gene 16S rRNA, e a porcentagem de similaridade é apresentada por meio da ferramenta BLAST.	68
Tabela 6.5 - Quantidade de sequências e UTOs atribuídas para cada amostra.	77
Tabela 6.6 - Índices de diversidade determinados no nível de 97% de similaridade, nas amostras dos reatores R1 e R2.....	77
Tabela 6.7 - Número de UTOs classificadas nos diferentes níveis taxonômicos e porcentagem em relação ao total de UTOs (97% de similaridade)	80
– Tabela 6.8 - Abundância relativa (%) dos filos observados nas amostras dos reatores R1 e R2, nos TDH de 24h e 12h	81
Tabela 6.9 - Principais resultados obtidos dos reatores R1 e R2, nos TDH de 24h, 12h e 6h.	102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ADP:** Adenosina Difosfato
- AMP:** Adenosina Monofosfato
- AlCl₃:** Cloreto de Alumínio
- APS:** Adenosina Fosfossulfato
- ATP:** Adenosina Trifosfato
- BaCl₂:** Cloreto de Bário
- BaSO₄:** Sulfato de Bário
- Bis:** N, N'-metileno bis acrilamida
- BRS:** Bactérias redutoras de sulfato
- CePTS:** Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento
- CO₂:** Dióxido de Carbono
- CONAMA:** Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CHCl₃:** Clorofórmio
- CuFeS₂:** Calcopirita
- CuS:** Sulfeto de Cobre
- CaSO₄:** Gesso
- DGGE:** *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* ou eletroforese em gel com gradiente desnaturante
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- DQO:** Demanda Química de Oxigênio
- EDTA:** etilenoaminotetraacetato de sódio diidratado
- FCC:** Flavocitocromo C Oxidoreductase
- FeS:** Sulfeto Metálico
- FeS₂:** Pirita
- HS⁻:** sulfeto
- H₂S:** sulfeto de hidrogênio
- H₂O₂:** peróxido de hidrogênio
- HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura
- NaOH:** hidróxido de sódio
- NH₄:** íon amônio
- NO₂⁻:** nitrito
- OD:** Oxigênio Dissolvido

PAPS: Fosfoadenosina Fosfosulfato
PBS: *Phosphate Buffer Saline* ou tampão fosfato salino
PCR: *Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase
pH: potencial hidrogeniônico
RFLR: *Reserve Fluidized Loop Reactor*
rpm: rotações por minuto
-SH: Sulfidrina
S⁰: Enxofre Elementar
S²⁻: Sulfeto
S₂O₃²⁻: Tiosulfato
SO₄²⁻: Sulfato
SOR: *Sulfito Dehidrogenase*
SQR: Quinona Sulfeto Oxidoreductase
STV: Sólidos Totais Voláteis
SOX: Oxidação de Enxofre
Taq: *Thermoaquaticus*
TDH: tempo de detenção hidráulica
TEMED: tetrametil etileno diamina
Tris: (hidroximetil) aminometano
UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* ou reator de manta de lodo de fluxo ascendente

1 INTRODUÇÃO

O reator UASB é uma tecnologia amplamente difundida no Brasil para tratamento de esgotos domésticos. Apesar das inúmeras vantagens, os efluentes de reatores anaeróbios necessitam de pós-tratamento para remoção de matéria orgânica residual e amônia (CHERNICHARO, 2007). Além disso, as bactérias redutoras de sulfato geram H_2S que pode permanecer na forma dissolvida no efluente. Em pH próximo de 7,0, o sulfeto pode estar na forma dissolvida (H_2S) e/ou na forma dissociada (HS^-) (YANG *et al.*, 2005). Portanto, uma das limitações dos reatores anaeróbios é o gerenciamento das emissões gasosas, especificamente, o sulfeto de hidrogênio (H_2S), por se tratar do principal responsável pela geração de mau odor nas proximidades das unidades de tratamento.

O sulfeto, desprendido do efluente dos reatores UASB para a atmosfera, pode ocasionar problemas a saúde dos seres humanos quando expostos a este gás (JENSEN *et al.*, 1995). De acordo com os limites estabelecidos pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA, 1995) para o controle de sulfeto em sistemas de tratamento de esgoto, o H_2S na concentração de 300 ppm apresenta possibilidade de ser letal. Além disso, o H_2S é capaz de ocasionar inibição do metabolismo dos micro-organismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica e também pode provocar a corrosão de estruturas metálicas e de concreto dos reatores (SPEECE, 1996).

O sulfeto pode ser oxidado por vários processos: químico ou biológico, com oxigênio, nitrato ou dióxido de carbono atuando como aceptores de elétrons (HOLMER e STORKHOLM, 2001). Ambos os processos geram a oxidação completa do sulfeto, porém, os processos biológicos oferecem vantagens operacionais, pois operam em temperatura ambiente e sob pressão atmosférica, sendo assim uma alternativa de baixo custo e de elevada eficiência para eliminação do H_2S e sua concentração pode permanecer menor que 1mg/L no efluente (MANZ, 1992; STAL, 1995; HENSHAW *et al.*, 1999).

De acordo com Janssen *et al.* (1999) há dois tipos de processos biotecnológicos para conversão do sulfeto a enxofre elementar. O primeiro processo ocorre em condições anaeróbias, pela atividade das sulfobactérias fototróficas verdes e púrpuras que realizam fotossíntese anoxigênica, e o segundo, ocorre em condições aeróbias sendo realizado por bactérias quimiolitotróficas. As sulfobactérias púrpuras e verdes usam energia da luz para

transferir elétrons do enxofre para redução do dióxido de carbono. A maioria das sulfobactérias púrpuras estocam grânulos de enxofre elementar dentro das células e realiza a oxidação completa a sulfato, enquanto que as sulfobactérias verdes deposita o enxofre fora das células (TANG *et al.*, 2009).

Em ambos os processos, a oxidação biológica pode ser parcial, de sulfeto a enxofre elementar (S^0), ou oxidação completa a sulfato (SO_4^{2-}). No entanto, há maior interesse em induzir a formação de S^0 , que ocorre em condições anaeróbias ou com baixas concentrações de oxigênio ($<0,1\text{mg/L}$), devido ao seu alto valor comercial, uma vez que é utilizado como matéria prima em indústrias de fertilizantes e de materiais manufaturados (VANNINI *et al.*, 2008; JANSSEN *et al.*, 2009).

No Brasil, os maiores produtores de enxofre são a Petrobrás, AngloGold Ashanti, Votorantim Metais - Níquel /Zinco e o grupo Paranapanema. Não obstante, as vendas da produção nacional de enxofre no mercado interno são segmentadas, sendo que a indústria de fertilizantes representa cerca de 82% do consumo total e em função desta demanda, o Brasil é um grande importador de enxofre (ABBATI e SILVA, 2008).

Vários estudos têm demonstrado a viabilidade de promover a oxidação biológica de sulfeto (KOBAYASHI *et al.*, 1983, SILVA *et al.*, 2002, KLEINJAN *et al.*, 2003, FERRERA *et al.*, 2004, KRISHNAKUMAR *et al.*, 2005, LOWACHARIN e ANNACHHATRE, 2010, FAJARDO *et al.*, 2012). A maioria desses estudos investigaram o processo de remoção biológica de sulfeto em reatores inoculados com cultura pura (ou mista) de bactérias e/ou investigaram a remoção de sulfeto de águas residuárias sintéticas ricas em sulfeto. Contudo, poucos estudos têm investigado o uso de reatores para remoção biológica de sulfeto dissolvido de efluente de reatores anaeróbios, tratando esgostos domésticos.

Em trabalho prévio, Souza *et al.* (2006), verificaram que a camada de espuma exposta a luz solar que se desenvolveu no decantador de reator UASB, tratando esgostos domésticos, continha micro-organismos capazes de realizar a remoção de sulfeto presente no efluente do reator. Em outro estudo, Garcia *et al.* (2012) também verificaram que a espuma do decantador do reator UASB continha sulfobactérias dos gêneros *Beggiatoa* e *Thiotrix*, capazes de remover compostos reduzidos de enxofre.

Com base em dados da literatura e nos resultados obtidos anteriormente com a espuma formada no decantador do reator UASB, desenvolveu-se a proposta do presente trabalho de promover a oxidação biológica de sulfeto com os micro-organismos presentes no efluente do reator UASB. O objetivo deste estudo foi desenvolver um processo biotecnológico de baixo custo para remoção de sulfeto dissolvido no efluente do reator anaeróbio e avaliar o potencial de recuperação de enxofre elementar. O princípio do processo consiste na conversão do sulfeto de hidrogênio a enxofre elementar pela atividade das bactérias oxidadoras de sulfeto.

A fim de cumprir o objetivo proposto, dois reatores foram projetados com configuração similar a um decantador de reator UASB, porém com maior capacidade de retenção de micro-organismos, uma vez que continham material suporte, com potencial de realizar a remoção biológica de sulfeto. A presente pesquisa foi financiada pela FINEP (no âmbito da rede de pesquisa Renutres) e fez parte do projeto do DESA/UFMG inserido na Chamada Pública MCT/MCIDADES/FINEP/Ação Transversal Saneamento Ambiental e Habitação - 7/2009.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Ciclo do enxofre*

O enxofre está entre os dez elementos mais abundantes na Terra sendo um elemento relativamente abundante na crosta terrestre e ocorre principalmente na forma de sulfatos solúveis. Grande parte dos reservatórios de enxofre inerte está em rochas sulfurosas, depósito de elementos sulfurosos e combustíveis fósseis. Naturalmente, o enxofre pode estar presente na forma de sulfetos metálicos como a pirita (FeS_2), calcopirita (CuFeS_2) e na forma de gesso (CaSO_4) (BITTON, 2005).

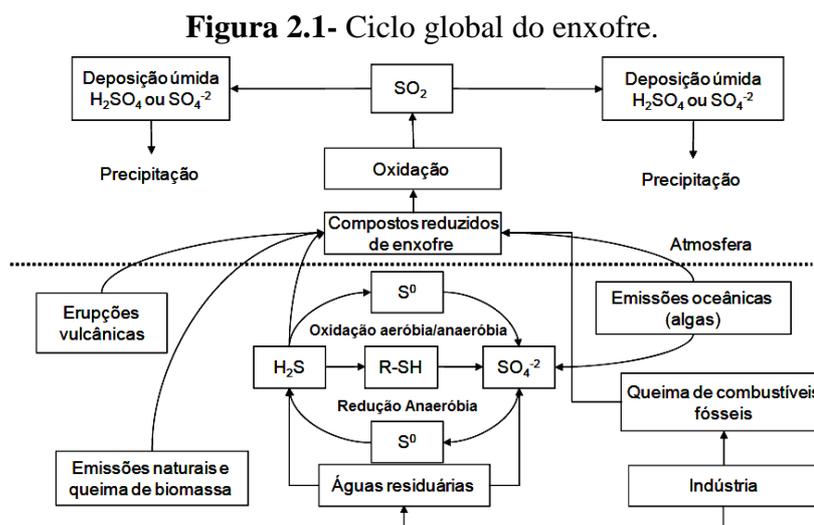
O enxofre na forma de sulfato (SO_4^{-2}) é um dos ânions mais abundantes no mar. O sulfato é largamente utilizado como matéria prima de muitos processos industriais, como a indústria de papel e celulose, indústria açucareira, indústria de borracha e pneumáticos, inseticidas e fungicidas, detergentes, corantes, complemento alimentar para gado, indústria mineradora, petrolíferas, entre outros (BITTON, 2005).

Na forma orgânica, o enxofre é um componente essencial do sistema de vida, estando contido em diversos aminoácidos na forma de radical sulfidril (-SH), além de ser componente essencial de várias co-enzimas. No ar, pode-se encontrar dióxido de enxofre (SO_2), sulfeto de

hidrogênio e dimetilsulfeto, sendo que na forma de H_2S é resultante da atividade vulcânica e do metabolismo microbiano (LENS & KUENEN, 2001; BITTON, 2005).

Todos os compostos de enxofre podem alcançar a superfície do solo pela precipitação das chuvas ou lixiviados nas águas subterrâneas. A queima de combustíveis fósseis pode liberar óxidos de enxofre, que em contato com a umidade do ar, produz ácido sulfúrico que é despejado na natureza através da chuva ácida, causando corrosão e prejudicando ecossistemas com pouca alcalinidade. A oxidação do enxofre na exploração de minas produz um lixiviado extremamente ácido, que pode penetrar no solo, contaminando o lençol freático (ATLAS & BARTHA, 2002).

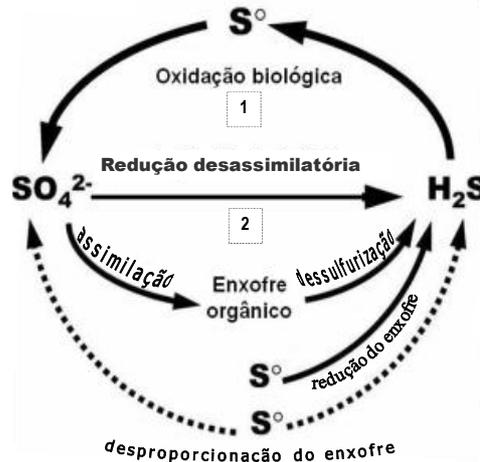
As fontes de enxofre em esgoto ou corpos d'água contaminados são o enxofre orgânico, encontrado em excretas humanas e em detergentes, e o sulfato, que é o ânion de maior prevalência em corpos d'água naturais. As transformações de enxofre podem ser visualizadas de forma simplificada na figura 2.1.



Fonte: Adaptado de Amim (2008)

O ciclo do enxofre é regido por reações de oxidação e redução, que são as responsáveis pelas conversões, as quais podem ser realizadas tanto por via química quanto biológica. Nos processos biológicos, várias espécies de micro-organismos catalisam a oxidação e redução das diferentes formas de enxofre estabelecendo deste modo um ciclo. O esquema simplificado do ciclo biológico do enxofre com as reações fundamentais está apresentado na figura 2.2.

Figura 2.2 - Representação esquemática do ciclo biológico do enxofre.



Legenda: 1 – Oxidação biológica de sulfeto realizada por sulfobactérias quimiolitotróficas ou fototróficas anoxigênicas. 2 – Redução de sulfato realizada por bactérias redutoras de sulfato.
Fonte: Adaptado de TANG *et al.*(2009).

Conforme figura 2.2, vários micro-organismos podem mineralizar compostos de enxofre orgânico, por meio de vias metabólicas aeróbias e anaeróbias. Sob condições aeróbias, enzimas sulfatases são envolvidas na degradação de Ester de sulfato ($R - O - SO_3^-$) ao íon sulfato. Em condições anaeróbias, aminoácidos contendo enxofre são degradados a compostos de enxofre ou a mercaptanas, que são compostos de enxofre odorantes (BITTON, 2005).

Particularmente, com relação ao sulfeto, este pode ser oxidado quimicamente ou biologicamente a enxofre elementar ou sulfato (figura 2.2, n.1) por uma variedade de micro-organismos, tais como sulfobactérias quimiolitotróficas, em condições aeróbias, e sulfobactérias fototróficas anoxigênicas, em condições anaeróbias. Por sua vez, o sulfato é reduzido de volta a sulfeto (figura 2.2, n.2) por bactérias redutoras de sulfato (TANG *et al.*, 2009).

2.2 Características do íon sulfato

O íon sulfato (SO_4^{2-}) é a forma mais difundida e mais estável dos compostos de enxofre e está presente de forma natural nas águas oceânicas, no solo e nas águas doces, que podem conter altas concentrações de sulfato provenientes de processos naturais e de atividades antropogênicas. Dentre os processos naturais, pode-se citar a percolação das águas pluviais que dissolvem o sulfato oriundo de sais minerais encontrados no solo (LENS *et al.*, 1998).

Segundo Lens *et al.* (1998), a contaminação por atividades antropogênicas está relacionada a emissão de efluentes domésticos e industriais. A concentração de sulfato em efluentes

domésticos pode variar entre 20 e 500 mg.L⁻¹ e entre 50 e 3000 mg.L⁻¹ em efluentes da indústria de papel (LENS *et al.*, 1998). Dentre as indústrias responsáveis pela emissão de sulfato no meio, estão inclusas as indústrias de alimentos, explosivos e as que utilizam águas contendo sulfato, como a água do mar. Especificamente na indústria de papel, a utilização de ácidos gera resíduos com concentrações de sulfato de 450mg/L⁻¹ a 800 mg.L⁻¹.

Apesar do íon sulfato ser um composto não tóxico e não volátil, a sua emissão é considerada ambientalmente impactante, pois a alta concentração do íon provoca um desbalanceamento no ciclo biogeoquímico do enxofre. De forma geral, os impactos causados pelo sulfato dependem da forma de emissão e da localidade, mas estão em sua maioria, ligados aos corpos hídricos e ao solo, onde o íon pode solubilizar metais pesados (BITTON, 2005).

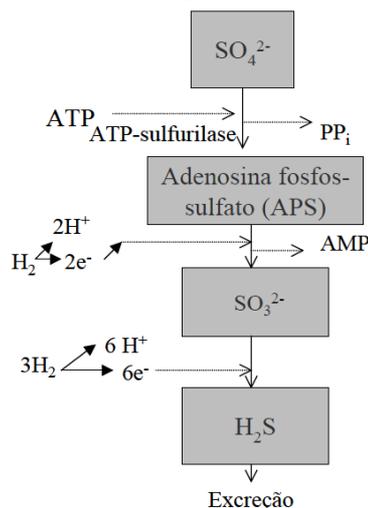
2.2.1 Redução Assimilatória do Sulfato

Sulfetos são produzidos pela assimilação e desassimilação da redução do sulfato. Diversos organismos, incluindo plantas superiores, algas, fungos e muitos procariontes utilizam SO₄⁻² como fonte de enxofre para síntese celular, realizando a redução assimilativa do íon sulfato. Nesse processo, o sulfeto gerado é imediatamente convertido a enxofre orgânico na forma de aminoácidos. O H₂S pode resultar da decomposição anaeróbia da matéria orgânica contendo aminoácidos de enxofre (S), tais como metionina, cisteína e cistina, por bactérias proteolíticas (*Clostridia*, *Vellionella*) (MADIGAN *et al.*, 2010).

2.2.2 Redução Desassimilatória do sulfato

A redução desassimilatória do sulfato é a mais importante fonte de H₂S em sistemas anaeróbios de tratamento de efluente industrial e doméstico. Essa redução é realizada por bactérias redutoras de sulfato (BRS), micro-organismos anaeróbios estritos pertencentes aos gêneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfomonas*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* e *Thermodesulfobacterium*. A redução desassimilativa do íon sulfato (figura 2.3) é o processo através do qual o sulfeto é excretado para o ambiente, ou seja, não é totalmente utilizado na síntese celular (MADIGAN *et al.*, 2010).

Figura 2.3 - Bioquímica da redução desassimilativa do íon sulfato.



Fonte: Madigan *et al.* (2010)

A figura 2.3 apresenta a bioquímica da redução desassimilativa do íon sulfato, PP_i representa a molécula de pirofosfato que foi substituída por uma molécula de sulfato na molécula de ATP (adenosina trifosfato) e AMP (adenosina monofosfato), resultante da ação da APS (adenosina fosfo-sulfato). O processo de redução de sulfato a sulfeto ocorre por meio de uma sequência de estágios intermediários resultando na transferência de oito elétrons do doador (por exemplo: H_2 , ácidos graxos, etanol) por mol de sulfato (SILVA, 2005).

O íon sulfato é estável e não pode ser utilizado sem ser ativado por meio de ATP, a enzima ATP-sulfurilase cataliza a ligação do íon sulfato a um fosfato da molécula de ATP, formando APS. Conforme mostra a figura 2.3, a molécula de APS é reduzida diretamente a sulfeto, mas na redução assimilativa, outro átomo de fósforo é adicionado à molécula de APS, formando fosfoadenosina fosfo-sulfato (PAPS) e a partir disto que o sulfato é reduzido. Em ambos os processos de redução de sulfato, assimilativo e desassimilativo, o íon sulfeto é o intermediário (SILVA, 2005).

2.3 Características do íon sulfeto

De acordo com Browker *et al.* (1989), o H_2S é um gás incolor, com odor de ovo podre e levemente mais pesado que o ar; é moderadamente solúvel em água e sua solubilidade decresce com a elevação da temperatura (2.945 mg/L a 28°C e 4.150 mg/L a 15°C).

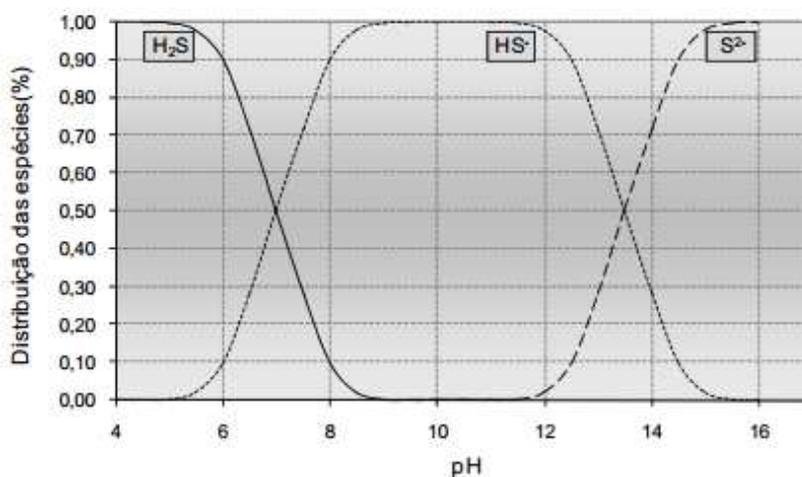
Conforme descrito anteriormente, o íon sulfeto é produto da redução do sulfato (SO_4^{2-}) e está distribuído nas formas S^{2-} , HS^- (formas ionizadas), H_2S (sulfeto de hidrogênio) e sulfetos

metálicos. A distribuição das formas de sulfeto acontece de acordo com o equilíbrio físico-químico. Quando em solução, o equilíbrio é regido pela equação 2.1 (LENS *et al.*, 1998):



Esta distribuição ocorre em função do pH (figura 2.4). Com o pH próximo de 7,0 pode estar na forma dissolvida (H_2S) e/ou na forma dissociada (HS^-) (YANG *et al.*, 2005). Contudo, o equilíbrio químico de H_2S e HS^- pode ser alterado quando ocorrem pequenas variações de pH na faixa entre 6,0 e 8,0. A figura 2.4 também mostra que a forma S^{2-} é mais estável em pH alcalino e que, na faixa de 7,5 a 9,0, as concentrações de H_2S representam menos de 20% do sulfeto total.

Figura 2.4 - Distribuição percentual das espécies de sulfeto em meio aquoso para diferentes valores de pH, para a temperatura de 25°C.



Fonte: LENS *et al.* (2008).

Além das fontes antropogênicas de emissão de sulfeto ligadas a descartes industriais, o sulfeto é liberado de efluentes de reatores anaeróbios, quando aplicados ao tratamento de águas residuárias contendo sulfato. O sulfeto produzido em reator anaeróbio é distribuído entre S^{2-} , HS^- e $\text{H}_2\text{S}_{\text{aq}}$ em solução, H_2S no biogás e sulfetos metálicos insolúveis de acordo com equilíbrio químico (LENS *et al.*, 1998). A principal desvantagem dos sistemas anaeróbios em geral, para o tratamento de águas residuárias ricas em sulfato, está associada a produção de sulfeto e seus efeitos nocivos serão descritos detalhadamente no próximo tópico.

2.4 Problemas Relacionados com Formação de Sulfetos em Sistemas Anaeróbios

A produção de sulfeto é o maior problema associado ao tratamento anaeróbio de águas residuárias contendo SO_4^{-2} . Para esgotos domésticos, a principal fonte de enxofre é o SO_4^{-2} na concentração de 40-200mg/L (ZHANG *et al.*, 2008). Especificamente, em reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), o sulfeto pode estar presente na forma dissolvida e gasosa, proveniente do metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (BRS).

As principais desvantagens da presença do sulfeto em reatores anaeróbios estão listadas na tabela 2.1, adaptado de Hulshoff-pol *et al.* (1998).

Tabela 2.1- Efeitos da formação de sulfeto em reatores anaeróbios.

Desvantagens	Vantagens
<ul style="list-style-type: none">• Redução na eficiência de remoção da DQO devido a presença de H_2S no efluente<ul style="list-style-type: none">• Corrosão• Acúmulo de material inerte no lodo (sulfetos metálicos)<ul style="list-style-type: none">• Menor formação de metano• Baixa qualidade do biogás + necessidade de remoção do sulfeto do biogás<ul style="list-style-type: none">• Mal odor• Toxicidade	<ul style="list-style-type: none">• Remoção de compostos de enxofre oxidado (sulfato e tiosulfato)<ul style="list-style-type: none">• Remoção de metais pesados• Precipitação de sulfetos metálicos (FeS); nesta forma é um bom precursor para granulação

Dentre os principais problemas associados à emissão do sulfeto de hidrogênio do sistema de tratamento de águas residuárias está a corrosão da estrutura dos reatores. Segundo Bryant *et al.* (1991), o sulfeto, sob condições anaeróbias, provoca a despolarização do ferro, o que gera a corrosão deste. Além disso, a formação de sulfetos de cobre (CuS e Cu_2S) é mais um indicativo de corrosão do cobre induzido pela atividade das bactérias redutoras de sulfato. Os problemas de corrosão do concreto têm sido reportados quando a concentração de sulfeto na água residuária é de 0,1 a 0,5mg /L, já a corrosão severa pode ocorrer com 2,0mg/L (ZHANG *et al.*, 2008).

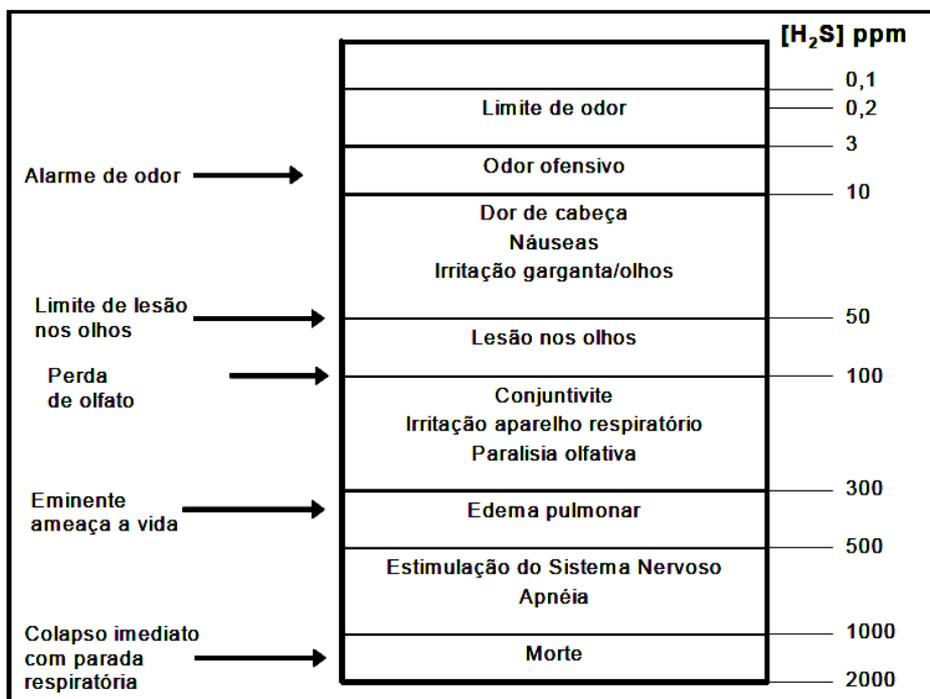
Outro problema decorrente do sulfeto de hidrogênio (H_2S) em altas concentrações é sua toxicidade para muitas bactérias, pois interfere no metabolismo assimilatório do enxofre, além de afetar o pH intracelular e resultar na inibição severa da atividade metabólica dos micro-organismos (OUDE EFERINK *et al.*, 1994).

Em condições anaeróbias, as BRS utilizam o sulfato como aceptor de elétrons na rota metabólica, para a degradação de compostos orgânicos e hidrogênio. Estas bactérias, por apresentarem maior afinidade pelo substrato, competem pelo hidrogênio e acetato usado pelas metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas, respectivamente; isto ocasiona inibição da metanogênese, sendo esta a etapa principal na remoção da matéria orgânica. Além disso, a competição entre BRS e metanogênicas resulta em baixo rendimento na produção de metano e alteração na qualidade do biogás, já que parte do sulfeto produzido termina como H₂S no biogás (OUDE EFERINK *et al.*, 1994).

Em contrapartida, o sulfeto presente no efluente do reator anaeróbico resulta numa diminuição da eficiência global de tratamento do sistema, com o sulfeto contribuindo também para a DQO do efluente tratado, já que são requeridos dois moles de oxigênio por mol de sulfeto oxidado completamente a sulfato. Nessas condições, pode ser necessário um sistema de pós-tratamento com finalidade de remover o sulfeto das águas residuárias (ZHANG *et al.*, 2008).

Conforme mostra a figura 2.5, no que se refere a exposição dos seres humanos ao sulfeto de hidrogênio, vários danos à saúde podem ocorrer, tais como: dores de cabeça, náuseas, edema pulmonar e apnéia (JENSEN *et al.*, 1995).

Figura 2.5 - Toxicidade do sulfeto de hidrogênio.



Fonte: Adaptado de EPA, (1995).

De acordo com os limites estabelecidos pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA, 1995) para o controle de sulfeto em sistemas de tratamento de esgoto, o H₂S na concentração de 300 ppm apresenta possibilidade de ser letal. Ainda, a sensibilidade olfativa de um indivíduo diminui com o tempo de exposição ao gás sulfídrico e sua presença pode não ser mais percebida após algum tempo de exposição (JENSEN *et al.*, 1995).

2.5 Processos químicos e biológicos para remoção de sulfeto em águas residuárias

Algumas estratégias para minimizar os problemas causados pela presença de sulfeto têm sido pesquisadas, tais como: (i) remoção química de metais pesados e sulfeto por meio de precipitação; (ii) controle de pH para assegurar maior produção de sulfeto na forma ionizada HS⁻, que é menos tóxica e necessária para síntese celular; (iii) aplicação de concentrações de oxigênio para promover a oxidação biológica parcial de sulfeto a enxofre elementar (HIRASAWA, 2008 e ZHANG *et al.*, 2008).

O sulfeto pode ser oxidado empregando-se sistemas de aeração não catalisados ou biocatalisados, eletroquimicamente, ou quimicamente, utilizando-se cloro, ozônio, permanganato de potássio ou peróxido de hidrogênio, com produção de enxofre elementar, tiosulfato ou sulfato, dependendo do pH. Além disso, o *stripping* do H₂S é um método físico considerado conveniente para remoção de sulfeto (LENS *et al.*, 1998).

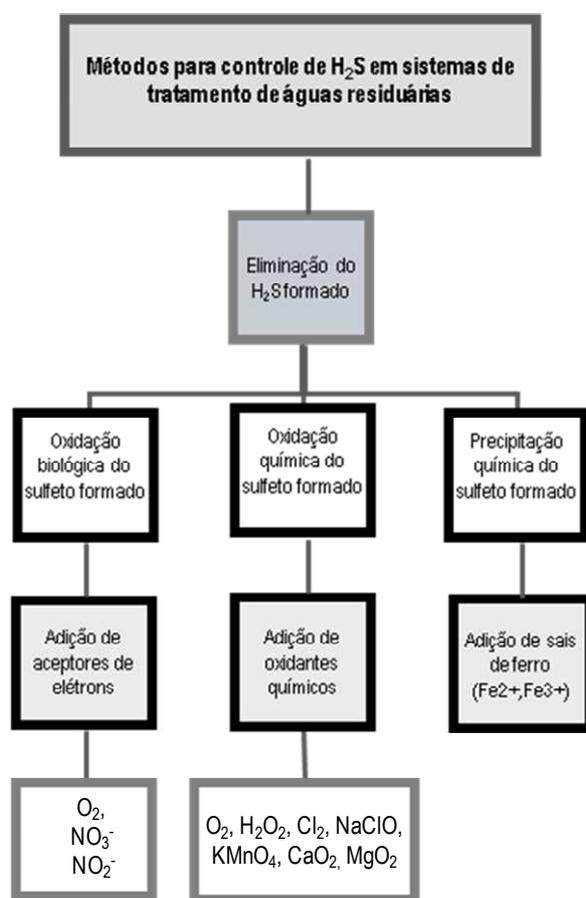
Dentre as desvantagens provenientes dos processos químicos podem ser citadas o alto custo operacional e de manutenção, elevado consumo energético, consumo de substâncias químicas com possibilidade de formação de subprodutos tóxicos. Adicionalmente, a reação dos oxidantes químicos com sulfeto de hidrogênio pode gerar ácido sulfúrico, que uma vez formado necessita de neutralização antes do descarte. Além disso, outra desvantagem destes processos é a operação em alta pressão e elevada temperatura (>850°C) (MANZ, 1992).

Em contrapartida, os processos biológicos oferecem vantagens operacionais, pois ocorrem em temperatura ambiente e sob pressão atmosférica sendo, portanto, alternativas de baixo custo. Segundo Henshaw *et al.* (1999) a aplicação de processo biológico pode promover a elevada eficiência para eliminação do H₂S e sua concentração pode permanecer menor que 1mg/L no efluente.

Os processos biológicos podem ser aeróbios ou anaeróbios, ambos utilizam bactérias sulfurosas. O processo anaeróbio é vantajoso, devido a simplicidade operacional e baixo custo. A oxidação biológica de sulfeto pode ser parcial a enxofre elementar (S^0), ou completa a sulfato (SO_4^{2-}), sendo que a oxidação biológica pode ocorrer mesmo quando o H_2S está presente em baixas concentrações (ELSHAHED *et al.*, 2003). O enxofre, quando formado, pode ser utilizado como fertilizante no solo ou fungicida (KLOK *et al.*, 2012).

A figura 2.6 apresenta as principais tecnologias químicas e biológicas para controle de emissão de sulfeto em sistemas de tratamento de efluentes domésticos.

Figura 2.6 - Processos químicos e biológicos para controle da emissão de H_2S .



Fonte: Adaptado de ZHANG *et al.* (2008).

Vários fatores inibem o metabolismo das BRS, dentre estes, as concentrações de oxigênio dissolvido maiores que 1,0mg/L, temperatura que não esteja na faixa de 25°C a 43°C e pH abaixo de 5,5 ou acima de 9,0. No entanto, a produção de sulfeto pode ocasionar problemas no processo de degradação anaeróbia da matéria orgânica e, por isso, deve ser avaliada com cautela (HOLMER e STORKHOLM, 2001).

Especificamente em reatores UASB, o sulfeto produzido durante a redução do sulfato pode ser oxidado por vários processos: oxidação química com oxigênio, oxidação biológica sob condições óxicas, oxidação fototrófica, oxidação química anóxica e oxidação biológica sob condições anóxicas (HOLMER e STORKHOLM, 2001). Ambos os processos, químico ou biológico, geram a oxidação completa do sulfeto. Entretanto, a oxidação biológica é mais rápida que a oxidação química (STAL, 1995).

A remoção biológica de sulfeto de águas residuárias pode ser classificada como método direto ou indireto. No método direto, o sulfeto é oxidado pela atividade das bactérias fotototróficas e quimiolitotróficas. No método indireto, a oxidação de compostos reduzidos de enxofre é realizada quimicamente por íon férrico como agente oxidante e as bactérias oxidadoras do íon férrico são usadas para regenerá-lo para posterior utilização (PAGELLA e FAVERI, 2000).

Os processos biológicos são muitas vezes considerados como uma alternativa vantajosa, visto que uma ampla variedade de micro-organismos é capaz de oxidar e reduzir espécies de enxofre transformando-os em compostos de fácil eliminação, além disso os processos biológicos possuem como vantagens baixo custo de operação, menor consumo energético, além de poderem ser operados a temperatura ambiente (PÉREZ e VILLA, 2004).

Por outro lado, uma desvantagem da oxidação biológica é quando ocorre geração de ácido sulfúrico, proveniente da ação oxidativa iniciada pela atividade metabólica das bactérias oxidadoras de sulfeto, que provoca a corrosão de materiais como concreto e aço. Esta rota metabólica é utilizada principalmente por *Thiobacillus thiooxidans*, espécie predominante em sistemas de tratamento de esgotos (HAO *et al.*, 1996).

2.6 Oxidação biológica de sulfeto a enxofre elementar

Ambientes ricos em compostos de enxofre como fontes termais, ventos termais oceânicos, zonas anaeróbias de lagos, superfícies marinhas e estuários, desempenham importante papel na manutenção da comunidade microbiológica. Ampla variedade de micro-organismos é capaz de oxidar, reduzir e desproporcionar espécies de enxofre. A estrutura da comunidade microbiana responsável pela oxidação de sulfeto é influenciada pelas condições que prevalecem no ambiente, tais como: pH, temperatura, concentrações de sulfeto e sulfato, potencial redox, disponibilidade de luz e matéria orgânica (ELSHAHED *et al.*, 2003).

Janssen *et al.* (1999) fizeram referência a dois tipos de processos biotecnológicos para conversão do sulfeto a enxofre elementar. A oxidação biológica do sulfeto pode ocorrer em condições aeróbias, anóxicas ou anaeróbias, com oxigênio, nitrato ou dióxido de carbono, respectivamente, atuando como aceptores de elétrons.

O primeiro processo ocorre em condições anaeróbias, pela atividade das sulfobactérias fototróficas verdes e púrpuras que realizam fotossíntese anoxigênica conforme apresentado na equação 2.2, ou seja, utilizam a luz como fonte de energia para transferir os elétrons do enxofre para redução do dióxido de carbono. Ao contrário da fotossíntese oxigênica (equação 2.3) que usa a água como doador de elétrons para produzir oxigênio, essas bactérias usam o H₂S como doador de elétrons, oxidando-o inicialmente a S⁰ e, posteriormente, a SO₄⁻² (FRIEDRICH *et al.*, 2005).



O segundo processo referido por Janssen *et al.* (1999) pode ser descrito pelas reações 2.4, 2.5 e 2.6. Este processo é realizado por bactérias quimiolitotróficas e ocorre em condições aeróbias, segundo Madigan *et al.* (2004), estas bactérias obtêm sua energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos e a síntese de ATP está ligada à oxidação do doador de elétrons. Neste processo, o oxigênio molecular é o acceptor final de elétrons e os elétrons derivados da oxidação de enxofre são usados para transformação de energia da cadeia respiratória e redução de dióxido de carbono (FRIEDRICH *et al.*, 2005)

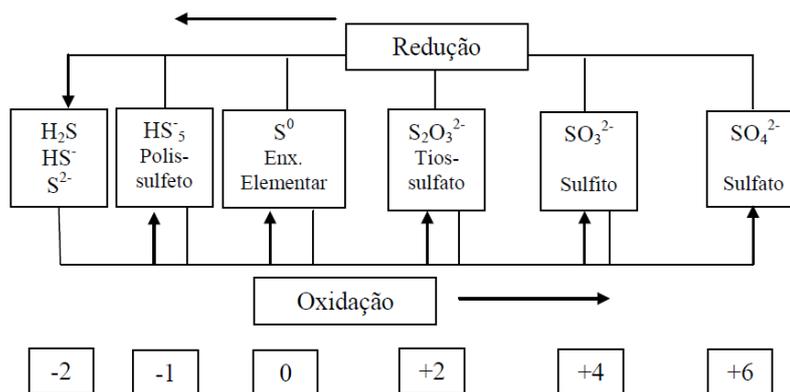


Dentre os compostos sulfurados utilizados como doadores de elétrons estão principalmente o sulfeto de hidrogênio (H₂S) e enxofre elementar (S⁰). Todavia, em condições anaeróbias, algumas bactérias oxidadoras de sulfeto podem crescer na presença de tiosulfato (S₂O₃²⁻), que atua como doador de elétrons, e com nitrato ou outros compostos nitrogenados como

aceptores de elétrons, que são metabolizados a sulfato e nitrogênio, respectivamente (FRIEDRICH *et al.*, 2005).

Entretanto, há maior produção de energia e maior número de elétrons participantes (figura 2.7) quando os compostos são oxidados a SO_4^{2-} , sendo este, portanto, o produto preferencial, desde que haja disponibilidade de oxigênio dissolvido.

Figura 2.7 - Ciclo do enxofre e seus estados de oxidação.



Fonte: Adaptado de FRIEDRICH *et al.* (2005)

Em ambientes naturais com baixos teores de oxigênio dissolvido, a oxidação do sulfeto é designada parcial e é limitada à produção de enxofre elementar. Segundo Hulshoff-Pol *et al.* (1998) e Janssen *et al.* (1997), a formação de enxofre elementar pode ser induzida mantendo-se baixas concentrações de oxigênio (<0,1mg/L). O enxofre elementar pode ser acumulado em grânulos intracelulares pelas sulfobactérias e posteriormente oxidado a sulfato (BUISMAN *et al.*, 1990).

O enxofre elementar biologicamente formado possui algumas características diferentes do enxofre formado quimicamente, este último é menos hidrofóbico, forma agregados e possui boa sedimentação. Além disso, o enxofre é estável em pH entre 7-10 e temperaturas entre 30 e 47°C, acima destas condições o S^0 desproporciona, formando sulfeto e sulfito (JANSSEN *et al.*, 1999).

Jansen *et al.* (2009) pesquisaram as propriedades coloidais do enxofre elementar biológico. De acordo com os autores, o enxofre elementar constitui-se de glóbulos transparentes, extracelular ou intracelular, podendo atingir diâmetro de 1µm, forma esférica ou elipsoidal, pode dissolver em vários solventes orgânicos tais como clorofórmio, acetona e etanol. Ainda não foi demonstrado que os glóbulos de enxofre são constituídos exclusivamente por enxofre.

Por questões ecológicas e ambientais, a formação de enxofre elementar é preferencial porque é insolúvel e assim, pode ser removido de meios líquidos, reduzindo-se o conteúdo total do composto enxofre de águas residuárias. Outra vantagem importante é o fato do enxofre elementar ser usado para produção de energia por vários grupos de micro-organismos (ELSHAHED *et al.*, 2003).

Portanto, a oxidação parcial é induzida quando há interesse de recuperação de enxofre elementar, seja para fins biotecnológicos, tal como a recuperação do enxofre, ou para remoção do mesmo de águas residuárias. Dentre os processos de separação disponíveis estão a filtração, flotação, extração, processo de membrana e sedimentação. Para escolha da técnica deve-se considerar o método que propicie a agregação das partículas de enxofre. No entanto, os mecanismos de formação de partículas não estão totalmente esclarecidos e a formação de polissulfetos dificulta a sedimentação (JANSSEN *et al.*, 1999; VAN DER ZEE *et al.*, 2007).

A recuperação do enxofre elementar é muito valiosa pelo fato do enxofre poder ser novamente empregado em processos industriais como produção de ácido sulfúrico, ou na agricultura, na composição de fertilizantes, entre outros processos (VANNINI *et al.*, 2008).

No Brasil, os maiores produtores de enxofre são a Petrobras, AngloGold Ashanti, Votorantim Metais - Níquel /Zinco e o grupo Paranapanema. Não obstante, as vendas da produção nacional de enxofre no mercado interno são segmentadas, sendo que a indústria de fertilizantes representa cerca de 82% do consumo total e, em função desta demanda, o Brasil é um grande importador de enxofre (ABBATI e SILVA, 2005). Segundo o Departamento Nacional de Produção Mineral, em 2006 o Brasil importou cerca de 3,1 milhões de toneladas de enxofre, representando o maior volume de enxofre importado nos sete anos anteriores.

2.6.1 Oxidação aeróbia de sulfeto por bactérias incolores

As bactérias oxidadoras de sulfeto denominadas incolores possuem esse adjetivo devido à ausência de fotopigmentos, apesar de ser reportado que colônias e cultivos podem apresentar coloração rosada devido ao alto conteúdo de citocromos nestas bactérias (PÉREZ e VILLA, 2004).

Estes micro-organismos apresentam diferentes formas, desde bacilos, espirilos, cocos até células filamentosas. Além disso, são encontradas em vários nichos ecológicos nos quais os

compostos reduzidos de enxofre estão presentes. As bactérias de enxofre incolores têm representantes quimiolitotróficas obrigatórias (*Thiobacillus* e *Thiomicrospira*), quimiolitotróficas facultativas (*Sulfolobus* e *Thermothrix*) e quimiolitoheterotróficas (*Beggiatoa*) (PÉREZ e VILLA, 2004).

As sulfobactérias incolores são adaptadas a ambientes que sofrem variações na concentração de oxigênio, tais como fontes hidrotermais e ambientes hipersalinos (VANNINI *et al.*, 2008); sedimentos de lagos (HOLMER e STORKHOLM, 2001), tapetes microbianos (STAL, 1995), lodos ativados (WILLIAMS e UNZ, 1985) e biofilmes (OKABE *et al.*, 1998). Nestas condições, estas bactérias oxidam o sulfeto nas condições proporcionadas pelas flutuações de oxigênio que ocorrem nestes ambientes.

A oxidação parcial do H_2S a S^0 pode ser realizada pelas sulfobactérias incolores (equação 2.5), no qual o S^0 produzido é acumulado em grânulos intracelulares e pode ser oxidado posteriormente a sulfato. Klok *et al.* (2013) propuseram que a oxidação de S^0 a SO_4^{-2} proceda por meio de uma via redutase sulfito dissimilatória reversa e sulfito dehidrogenase.

Devido a sua capacidade de oxidar o sulfeto, as sulfobactérias incolores são de grande interesse sanitário e tem sido utilizadas para remoção deste composto de efluentes de reatores anaeróbios. As espécies mais relatadas na literatura presentes em sistemas de tratamento de esgotos são *Thiobacillus* e *Beggiatoa* (PÉREZ e VILLA, 2004).

Apesar da presença de *Beggiatoa* e *Thiothrix* ser considerada um problema em sistemas como lodos ativados, pois podem estar envolvidas com o entumescimento (*bulking* filamentoso) do lodo, estas espécies têm sido utilizadas em processos biológicos como uma alternativa biotecnológica para a eliminação do sulfeto de hidrogênio de águas residuárias (WILLIAMS e UNZ, 1985).

Espécies do gênero *Beggiatoa*, *Thiothrix* e *Thiospira* podem acumular o enxofre produzido dentro das células, o que dificulta a extração do enxofre produzido. Espécies de *Beggiatoa* apresentam destaque devido à sua predominância em ambientes sulfurosos. Essa bactéria cresce na presença de sulfeto ou tiosulfato e utiliza nitrato, nitrito, amônio e certos aminoácidos como fonte de nitrogênio. São bactérias filamentosas autótrofas facultativas, as quais em pH neutro e na presença de O_2 , oxidam H_2S a S^0 ou HS^- a S^0 , quando o pH está

moderadamente alcalino. O enxofre elementar pode ser estocado como grânulo intracelular e pode ser subsequentemente oxidado a sulfato (KAMP *et al.*, 2006).

Em condições anaeróbias, bactérias do gênero *Beggiatoa* utilizam nitrato no lugar de oxigênio para oxidar o sulfeto; algumas espécies contêm vacúolos no qual o nitrato pode ser estocado em concentrações de 160 mmol/L. Quando o nitrato é usado como acceptor de elétrons ocorre mudanças no pH do meio, a oxidação de H₂S a S⁰ aumenta o pH, enquanto a oxidação de S⁰ a SO₄²⁻ diminui o pH. Outra bactéria oxidadora de sulfeto incolor, *Thioploca* sp, também é capaz de oxidar sulfeto acoplado a redução de nitrato a amônia (KAMP *et al.*, 2006).

Ao contrário das espécies citadas, algumas espécies do gênero *Thiobacillus* produzem o enxofre extracelular, fator que traz vantagens na utilização do gênero. *Thiobacillus* utiliza compostos inorgânicos como fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono, crescem lentamente e são muito pequenos, o que dificulta a identificação em cultivos puros, mas com análises de biologia molecular é possível a identificação destas cepas (STAL, 1995).

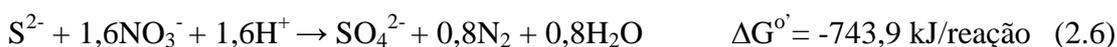
Janssen *et al.* (1999) reportaram que micro-organismos do gênero *Thiobacillus* podem competir com sucesso com processos químicos devido a sua alta afinidade por sulfetos. No entanto, como a formação do sulfato produz mais energia, essa rota é preferencialmente realizada pelos micro-organismos. Assim, a formação de enxofre elementar somente ocorrerá sob concentrações limitadas de oxigênio ou alta concentração de sulfeto.

A desvantagem da oxidação biológica mediada pelas sulfobactérias incolores é a operação do reator sob condições aeróbias, que agrega custos devido à aeração. Uma forma de minimizar estes custos é a realização da oxidação de sulfeto associada à desnitrificação, porém torna-se necessário um efluente rico em nitrato (acceptor final de elétrons usado na oxidação do H₂S) (TANG *et al.*, 2009). Este processo é denominado desnitrificação autotrófica, no qual as bactérias quimiolitotróficas são capazes de oxidar compostos inorgânicos reduzidos de enxofre, como sulfetos (S²⁻), enxofre elementar (S⁰), tiosulfato (S₂O₃²⁻), ou sulfito (SO₃²⁻), a partir da redução de nitrato ou nitrito (KUENEN *et al.*, 1992).

Na desnitrificação autotrófica, a espécie que tem sido mais estudada é *Thiobacillus denitrificans*, uma sulfobactéria anaeróbia facultativa, litoautotrófica obrigatória, que difere por sua habilidade de crescer anaerobiamente com tiosulfato, como doador de elétrons, e com nitrato, como acceptor de elétrons (FRIEDRICH, 1998). Além de *Thiobacillus*

denitrificans, as espécies *Thiomicrospira denitrificans* e *Pseudomonas stutzeri*, esta última desnitrificante heterotrófica, também são conhecidas por serem capazes de realizar a oxidação autotrófica de compostos de enxofre acoplada à redução de compostos nitrogenados (MAHMOOD *et al.*, 2009).

A equação 2.6 descreve a redução de nitrato utilizando sulfeto como fonte de energia, produzindo sulfato e nitrogênio. Dependendo das condições operacionais do sistema, a oxidação de sulfeto também pode gerar enxofre elementar conforme mostra a equação 2.7.



Além disso, também é possível ocorrer a desnitrificação com a oxidação de enxofre elementar a sulfato como representa a reação abaixo (equação 2.8), esta rota ocasiona consumo da alcalinidade, ao contrário da rota em que o sulfeto é oxidado a enxofre elementar (BERISTAIN-CARDOSO *et al.*, 2006)



Krishna e Philip (2005), avaliaram a desnitrificação autotrófica por *Thiobacillus denitrificans* na presença de sulfeto. Os autores observaram a oxidação completa de sulfeto pelo processo de desnitrificação autotrófica. Os resultados demonstraram que 40% a 60% da concentração inicial de sulfeto foi convertida a sulfato e o restante a enxofre elementar. O micro-organismo apresentou velocidade máxima específica de crescimento de $0,63\text{h}^{-1}$, com tempo de duplicação de 1h. A velocidade de redução de nitrato ficou em torno de $0,05\text{g de N.gSSV.h}^{-1}$.

2.6.2 Oxidação anaeróbia de sulfeto por sulfobactérias verdes e púrpuras

As bactérias fototróficas correspondem a um grande grupo de micro-organismos metabolicamente diversos, agrupados em função da utilização de sulfeto e de sua pigmentação. As bactérias fototróficas têm importante papel no metabolismo anaeróbio da matéria orgânica, como produtores primários (fotoautotróficos) ou como consumidores de compostos orgânicos reduzidos (fotoheterotróficos) (MADIGAN *et al.*, 2010).

As bactérias fototróficas púrpuras e verdes são divididas em seis famílias, incluídas nas ordens *Rhodospirillales* e *Chlorobiales*, respectivamente. As bactérias fototróficas púrpuras são representadas pelas famílias *Chromatiaceae*, *Rhodospirillaceae* e *Ectothiorhodospiraceae*; enquanto as bactérias fototróficas verdes, pelas famílias *Chloroflexaceae*, *Chlorobiaceae* e *Heliobacteriaceae*. Em processos de tratamento de águas residuárias, as bactérias fototróficas vivem em simbiose com outros heterótrofos e fotoautótrofos (STAL, 1995). Alguns micro-organismos heterotróficos (ex. *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) foram relatados na literatura por serem responsáveis pela oxidação do enxofre em solos alcalinos e neutros (PAUL e CLARK, 1989).

Os principais gêneros de bactérias púrpuras reportados na literatura são *Chromatium*, *Rhabdochromatium*, *Thermochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thioalkalicoccus*, *Thiorhodococcus*, *Thiocapsa*, *Thiocystis*, *Thiococcus*, *Thiospirillum*, *Thiodictyon*, *Thiopedia*, *Ectothiorhodospira*, *Thiorhodospira* e *Halorhodospira*. Embora a luz seja a principal fonte de energia destes micro-organismos, o crescimento litoautotrófico na ausência de luz tem sido relatado em *Allochromatium vinosum* e *Thiocapsa roseopersicina*. Nas sulfobactérias verdes, os principais gêneros representantes são *Chlorobium*, *Prosthecochloris*, *Pelodictyon*, *Ancalochloris*, *Chloronema* e *Chloroherpeton* (TANG *et al.*, 2009).

Conforme Holt e John (1994), as sulfobactérias fototróficas apresentam diferentes morfologias tais como: células esféricas, espiraladas e bacilos com dimensões que podem variar de 0,3 – 6,0 µm. As sulfobactérias púrpuras podem ocorrer isoladamente ou em agregados podendo formar filamentos, além disso, essas bactérias podem permanecer imóveis ou movimentar-se por flagelo. As cores das suspensões de células variam a partir de violeta-púrpura a vermelho-púrpuro e vermelho rosado. Enquanto que as sulfobactérias verdes são imóveis e as cores das suspensões de células variam de marrom amarelado, marrom e verde. Geralmente, as espécies de sulfobactérias verdes que são anaeróbias obrigatórias estão dentre os isolados cultivados. O grupo é morfologicamente restrito e inclui bacilos curtos e longos (MADIGAN *et al.*, 2010).

No que se refere a presença de pigmentos, ambas sulfobactérias contém bacterioclorofilas, sendo que as sulfobactérias verdes contém bacterioclorofilas *a*, *c*, *d* ou *e*, enquanto que as púrpuras contém bacterioclorofila *a* ou *b* (ACHENBACH *et al.*, 2001).

As bacterioclorofilas nas sulfobactérias verdes são encontradas em vesículas chamadas de clorossomos, estas vesículas são subjacentes e ligadas à membrana plasmática. A existência destes clorossomos confere a estes micro-organismos a capacidade de crescerem em intensidade de luz mais baixa que aquela requerida por outros organismos fototróficos (TANG *et al.*, 2009). Nas sulfobactérias púrpuras, as bacterioclorofilas estão localizadas nas invaginações da membrana plasmática. A condição anaeróbia é fundamental para estes micro-organismos, já que na presença do oxigênio a síntese de pigmentos é inibida (TORTORA *et al.*, 2003).

Devido à sua tolerância por ambientes com pouco oxigênio, as sulfobactérias púrpuras e verdes crescem em ambientes que contém grande quantidade de matéria orgânica em decomposição e se adaptam principalmente a ambientes neutrofilicos e mesofílicos. Além disso, são extremamente adaptadas a flutuações óxica-anóxicas, gradientes de sulfeto-oxigênio e flutuações diurno-noturno (ELSHAHED *et al.*, 2003).

Na natureza, as bactérias fototróficas púrpuras e verdes também são encontradas em lagos ricos em sulfeto, lagoas poluídas por esgoto e em águas termais. Nos lagos, esses micro-organismos podem apresentar densidades extremamente altas sob condições ambientais favoráveis que incluem quantidade suficiente de luz na região anaeróbia, além da presença de doadores de elétrons (VARESCHE, 1997). As bactérias verdes sulfurosas requerem pouca luz para a realização das atividades fotossintéticas, sendo estas geralmente encontradas nas maiores profundidades de lagos, quando comparadas com outros organismos fototróficos (MADIGAN, 2010).

Em sistemas de tratamento de esgoto, as bactérias fototróficas púrpuras e verdes foram encontradas (SIEFERT *et al.*, 1978). O estudo utilizou amostra de lodo ativado e foi avaliado a distribuição de bactérias fototróficas na amostra, sendo que 51% a 75% corresponderam a *Rhodopseudomonas sphaeroides* e *Rhodopseudomonas gelatinosa*, 6% a 25% foram *Rhodopseudomonas palustris* e *R.capsulata*, 1% a 5% foram de *Rhodospirillum tenue* e *Rhodopseudomonas viridis*. Enquanto que *Chromatium vinosum*, *Thiocapsa roseopersicina* e *Chlorobium limicola* foram presentes em menor proporção (<1%).

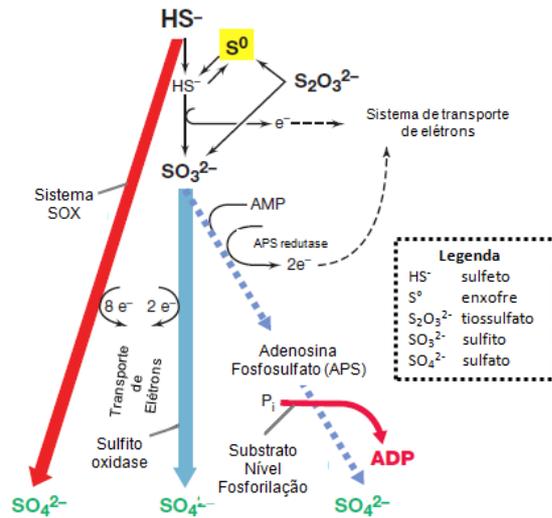
Estudo realizado em biofilmes naturais revelou a ocorrência de competição pelo sulfeto entre bactérias sulfurosas incolores e púrpuras. Neste estudo, as bactérias púrpuras foram capazes de se moverem pelo sedimento em condições de baixa intensidade de luz; esta característica as tornaram mais eficientes no consumo de sulfeto acumulado na camada anóxica do sedimento do que as bactérias incolores (JORGENSEN e DES MARAIS, 1986).

2.6.3 Mecanismos e enzimas envolvidas na oxidação biológica de sulfeto em quimiolitotróficas

As bactérias oxidadoras de sulfeto usam diferentes enzimas e mecanismos de transporte de elétrons e conservação de energia para oxidação de sulfeto. Dentre os sistemas de oxidação presentes nas quimiolitotróficas, em dois sistemas o substrato inicial H_2S , tiosulfato e enxofre elementar devem ser primeiramente reduzidos a sulfeto (SO_3^{-2}), partindo-se do sulfeto, 6 elétrons são liberados e posteriormente, o sulfeto é oxidado a sulfato (MADIGAN *et al.*, 2010).

O sistema mais amplamente difundido é aquele que utiliza a enzima sulfeto oxidase, esta enzima transfere os elétrons do SO_3^{-2} diretamente ao citocromo *c*, ocorrendo a síntese de ATP durante este transporte de elétrons e geração de uma força próton motiva. Em outro sistema utilizado por algumas sulfobactérias, a oxidação de SO_3^{-2} a SO_4^{-2} ocorre pela reversão da atividade da adenosina fosfosulfato (APS) redutase, uma enzima essencial do metabolismo de BRS. Essa reação que ocorre na direção de produção de SO_4^{-2} , produz uma ligação fosfato rica em energia quando o AMP [nucleotídeo regulatório (que atua como sinal, em vez de ser incorporado ao RNA ou DNA) que participa da repressão catabólica] é convertida em ADP (adenosina difosfato), conforme figura 2.8. Quando o tiosulfato atua como doador de elétrons, o mesmo é inicialmente clivado em S^0 e SO_3^{-2} , os quais podem ser eventualmente oxidados a SO_4^{-2} (MADIGAN *et al.*, 2010).

Figura 2.8 - Bioquímica da oxidação de sulfeto por bactérias quimiolitotróficas.



O sistema enzimático de oxidação de enxofre (SOX), sulfeto dehidrogenase (SOR) e quinona sulfeto oxidoreductase (SQR) tem sido reportado (LUO *et al.*, 1996; FRIEDRICH *et al.*, 2005; KLOK *et al.*, 2013). Segundo o trabalho desses autores, os elétrons derivados da oxidação de sulfeto entram na cadeia respiratória ao nível de citocromo *c* com a adição do flavocitocromo *c* oxidoreductase (FCC). Esta enzima é uma parte do sistema respiratório e oxida HS⁻ a S⁰ com o citocromo *c* como aceptor de elétrons. O citocromo *c* e ubiquinona podem ser oxidados pelo oxigênio via complexo oxidase, tais como citocromo *c* oxidase e quinol oxidase, respectivamente. Enquanto que a oxidação de S⁰ a SO₄⁻² procede via redutase sulfito dissimilatória reversa e sulfito dehidrogenase.

2.6.4 Mecanismos e enzimas envolvidas na oxidação biológica de sulfeto em sulfobactérias verdes e púrpuras

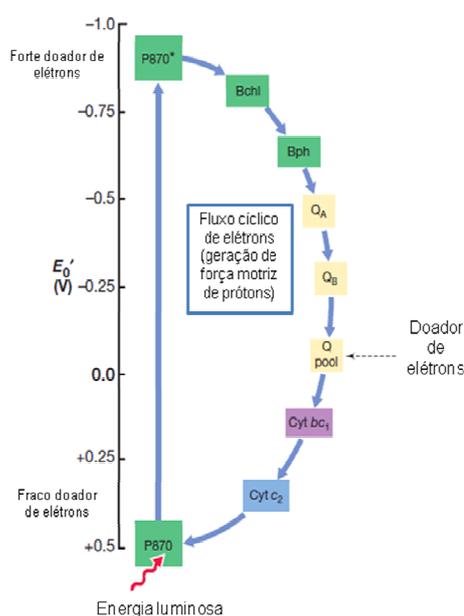
O aparato fotossintético de bactérias sulfurosas púrpuras tem sido reportado como um sistema de membrana intracitoplasmática, o centro da reação dessas bactérias consiste de três polipeptídeos, designados L, M e H. Essas proteínas, juntamente com uma molécula do citocromo *c* estão firmemente inserida na membrana fotossintética.

O fotocomplexo consiste de um par de bacterioclorofilas *a*, chamado de par especial, mais duas bacterioclorofilas *a*, que funcionam no fluxo de elétrons, duas moléculas de bacteriofeofitina (bacterioclorofila sem o átomo de magnésio), duas moléculas de quinona e um pigmento carotenóide. Todos os componentes do centro de reação estão integrados de forma que

possam interagir em reações de transferência de elétrons, nos estágios iniciais de conversão de energia fotossintética.

As reações começam quando a energia atinge o par especial de bacterioclorofilas *a*. A absorção de energia excita o par especial, convertendo-o de um fraco doador de elétrons para uma forte doador de elétrons (com potencial de redução muito eletronegativo). Uma vez que este forte doador foi produzido, as etapas restantes no fluxo de elétrons conservam a energia liberada quando os elétrons fluem através da membrana de baixo E_0' para elevado E_0' , gerando uma força próton motiva (figura 2.9).

Figura 2.9 - Fluxo de elétrons na fotossíntese anoxigênica em bactérias sulfurosas púrpuras.



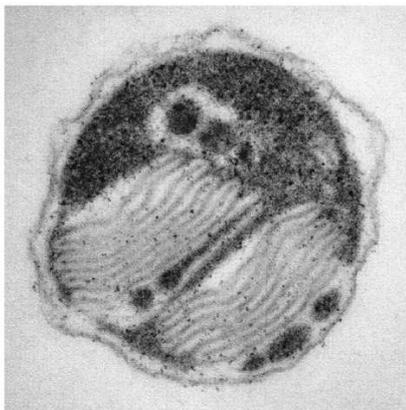
Legenda: P870-fraco doador de elétrons, P870*-forte doador de elétrons, Bph-bacteriofeofitina, QA,QB-quinonas intermediárias, Qpool-pool de quinonas da membrana fotossintética, Cyt-citocromo.
Fonte: MADIGAN *et al.* (2010).

Antes de excitação, o centro de reação que é chamado de P870, tem um E_0' de cerca de 0,5 V e depois da excitação, o potencial tem de cerca de -1,0 V. O elétron dentro do P870 prossegue para reduzir uma molécula de bacterioclorofila *a*, dentro do centro de reação. Uma vez reduzida, a bacterioclorofila *a* reduz posteriormente a bacteriofeofitina *a* que reduz as moléculas de quinona no interior da membrana. A partir das quinonas, os elétrons são transportados na membrana por meio de uma série de proteínas ferro-enxofre e citocromos que eventualmente, retornam para o centro da reação. As proteínas chaves do transporte de elétrons incluem o citocromo bc1 e c2, sendo que o último é um citocromo periplasmático que doa elétrons para o par especial de bacterioclorofilas *a*, ocasionando o retorno dessas moléculas

para seu estado original com potencial E_0' de 0,5 V. Assim, o centro da reação é então capaz de absorver novamente energia e repetir o processo.

Com relação ao crescimento autotrófico das sulfobactérias púrpuras, a síntese de ATP não é suficiente. Um poder redutor (NADH ou NADPH) é necessário, de modo que o CO_2 possa ser reduzido, o poder redutor de sulfobactérias púrpuras origina-se com o H_2S , embora S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ e mesmo Fe^{2+} ou NO^{2-} possam ser utilizados por várias espécies. Quando o H_2S corresponde ao doador de elétrons, glóbulos de S^0 são armazenados no interior das células. Substâncias reduzidas como H_2S , são oxidadas por citocromos do tipo *c*, sendo os elétrons eventualmente transferidos ao “pool de quinonas” da membrana fotossintética (figura 2.10).

Figura 2.10 - Membrana fotossintética em sulfobactérias púrpuras.



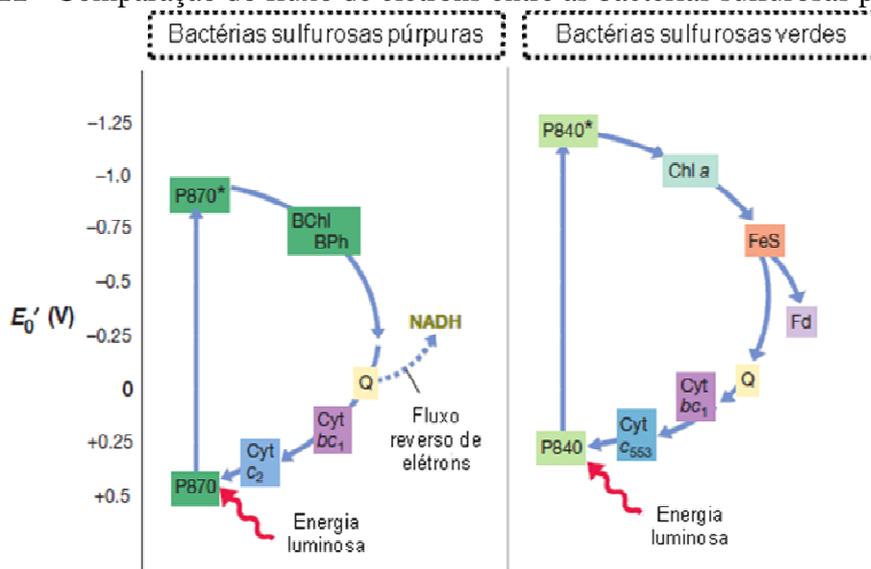
Fonte: MADIGAN *et al.* (2010).

No entanto, o E_0' da quinona (cerca de 0 volts) é insuficientemente eletronegativo para reduzir diretamente o NAD^+ (-0,32 V). Em vez disso, os elétrons do pool de quinona devem ser retrocedidos de maneira forçada contra o gradiente termodinâmico, para eventualmente reduzir NAD(P)^+ a NAD(P)H . Esse processo, que requer energia, é denominado transporte reverso de elétrons, sendo dirigido pela energia da força próton motiva e envolve uma reversão da atividade normal do complexo I da cadeia de transporte de elétrons; o complexo I oxida NADH e reduz quinona. Se NAD(P)H é necessário como um redutor em vez de NADH , portanto, o NAD(P)H pode ser produzido do NADH por enzimas denominadas transidrogenases. O fluxo reverso de elétrons também é o mecanismo pelo qual as bactérias quimiolitotróficas obtêm seu poder redutor para a fixação de CO_2 , em muitos casos, a partir de doadores de elétrons E_0' positivos (MADIGAN *et al.*, 2010).

Por outro lado, o centro da reação fotossintética em bactérias não sulfurosas verdes e bactérias sulfurosas púrpuras são estruturalmente similar, contudo, o centro da reação em bactérias sulfurosas verdes difere significativamente das bactérias não sulfurosas púrpuras e verdes. Na figura 2.11 é possível observar que o centro da reação nas bactérias sulfurosas verdes é significativamente mais eletronegativo que nas bactérias sulfurosas púrpuras e que a clorofila *a* (sulfobactérias verdes) está presente no centro da reação.

Assim, ao contrário das bactérias sulfurosas púrpuras onde a primeira molécula receptora estável (quinona) tem E_0' cerca de 0V, o receptor FeS (proteína ferro-enxofre) das bactérias sulfurosas verdes é muito mais eletronegativo do que o NADH. Isto tem um efeito importante na síntese do poder de redução dessas bactérias, já que o fluxo reverso de elétrons, necessário nas bactérias sulfurosas púrpuras, não é requerido nas bactérias sulfurosas verdes (MADIGAN *et al.*, 2010).

Figura 2.11 - Comparação do fluxo de elétrons entre as bactérias sulfurosas púrpuras e verdes



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

2.6.5 Oxidação biológica e química do enxofre elementar

Esta oxidação é realizada principalmente por micro-organismos aeróbios (equação 2.9), gram-negativos, não formadores de esporos (*Acidithiobacillus thiooxidans*, anteriormente denominado, *Thiobacillus thiooxidans*), que crescem em um pH muito baixo.

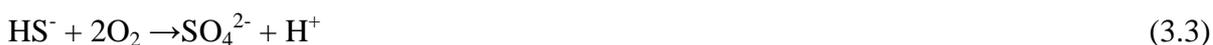


Outros oxidantes do enxofre são as arqueias do gênero *Sulfolobus*, tais como as espécie *Sulfolobus metallicus*, acidófila termófila, encontradas em fontes termais com pH ácido variando de 2 a 3 e temperaturas elevadas de 55 a 85°C. Estes micro-organismos se desenvolvem pela oxidação do ferro ferroso, compostos reduzidos de enxofre inorgânico ou minérios de sulfeto (FRIEDRICH, 2005).

Alguns micro-organismos heterotróficos (ex. *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) também são responsáveis pela oxidação do enxofre em solos alcalinos e neutros (PAUL e CLARK, 1989).

A oxidação química também tem sido reportada como a ocorrência espontânea em soluções aquosas que contenham sulfeto na presença de oxigênio. Alguns trabalhos têm sido publicados com o objetivo de avaliar as reações em águas puras, salinas ou ainda em esgoto sanitários com o uso de diferentes concentrações de sulfeto e oxigênio dissolvido, além de diferentes valores de pH e de temperatura (BUISMAN *et al.* 1990; SANTOS *et al.*, 2009).

González-Sánchez e Revah (2007) descreveram alguns fatores que podem influenciar a estequiometria e cinética da oxidação química, tais como: relação molar sulfeto/oxigênio, pH, temperatura, força iônica e presença de catalisadores ou inibidores. Steudel (2000) descreveu as reações de oxidação do sulfeto e seus principais produtos formados: enxofre elementar, tiosulfato, sulfito e sulfato, como segue nas equações 3.0 a 3.3, respectivamente. As reações são catalisadas por íons metálicos e os produtos da reação dependem das condições do meio como relação sulfeto/oxigênio e principalmente pH e potencial redox.



Um ponto relevante da oxidação química é a formação de tiosulfato, que, de acordo com Kuenen (1975), não ocorre na oxidação biológica. Segundo Klok *et al.* (2012), a formação de tiosulfato em reatores pode ser devido a oxidação abiótica de polissulfetos e hidrólise de enxofre elementar, ou ainda é proveniente da capacidade de alguns micro-organismos

oxidarem sulfeto a tiosulfato. Atualmente, é possível que a formação de tiosulfato seja favorecida com o aumento do pH (acima de 8,5).

Van den Ende e Van Gernerden (1993) relataram o tiosulfato como produto da oxidação de sulfeto, mas atribuíram neste trabalho, que o tiosulfato foi formado pela contribuição da oxidação química no processo biológico. Steudel (2000) observou a formação de tiosulfato como produto da auto-oxidação de polissulfetos e Janssen *et al.* (1997) observaram diminuição na conversão de sulfeto a enxofre elementar, quando houve aumento da produção de tiosulfato.

2.6.6 Remoção biológica de sulfeto de hidrogênio em reatores

Kobayashi *et al.* (1983) estudaram a remoção de sulfeto de águas residuárias domésticas com tratamento anaeróbio por bactérias fototróficas em dois reatores distintos: um sistema de reatores com colunas e um sistema submerso. Com tempo de retenção celular de 24h e com taxa de aplicação de $0,107\text{kgS}^{2-}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, 95% de remoção foi alcançada no sistema de reatores com colunas. No sistema submerso, com tempo de retenção celular de 0,66h e com taxa de aplicação de $0,0362\text{kgS}^{2-}/\text{m}^3\cdot\text{d}$, 98% do sulfeto foi removido. Em ambos os casos, o produto final da oxidação foi sulfato.

Janssen *et al.* (1995) trabalharam com reatores em bateladas contendo biomassa em suspensão de *Thiobacillus neapolitanus*. Os reatores foram operados sob excesso de oxigênio (3mg/L) e após 5h, o sulfeto introduzido foi convertido a sulfato. Por outro lado, sob condições limitantes de oxigênio dissolvido (0,5-1,0 mg/L), o enxofre elementar e tiosulfato foram produzidos, entretanto, no decorrer da operação dos reatores, o sulfato foi o principal produto da oxidação do sulfeto.

Silva *et al.* (2002) observaram um reator operado sob condições anaeróbias para remoção de sulfato de águas residuárias. A análise por meio de fluorescência de Raios X com dispersão de energia (EDXRF) revelou que o precipitado formado sobre o material suporte utilizado para imobilização de BRS continha 87% de elemento enxofre e o restante estava combinado com outros elementos, principalmente, sódio.

Kleinjan *et al.* (2003) sugeriram que as biotecnologias de remoção de sulfeto devem usar preferencialmente os micro-organismos que armazenam enxofre extracelularmente, devido a

separação mais fácil de enxofre a partir da biomassa. Nesse sentido, Ferrera *et al.* (2004) utilizaram um biorreator, em escala de bancada, com biomassa composta por cultura pura de *Chlorobium limicola*, bactéria cujos grânulos de enxofre são depositados fora da célula. A eficiência obtida na remoção de sulfeto foi de 99,5%, quando aplicou-se 0,0016 kgS²⁻/m³.d de sulfeto no biorreator com biofilme. Contudo, sulfato e enxofre elementar não foram quantificados.

Segundo Ferrera *et al.* (2004), a maioria dos sistemas propostos na literatura utilizam culturas puras de sulfobactérias com crescimento em suspensão e operam reatores com agitação contínua onde a biomassa pode ser facilmente levada juntamente com o líquido, resultando em acúmulo de sulfeto de hidrogênio no reator. Segundo os autores, este problema pode ser evitado pela utilização de reatores com biofilme, que proporcionam maior estabilidade ao sistema.

Silva (2005) desenvolveu um sistema de tratamento no qual o efluente do reator em batelada sulfetogênico foi tratado em reator aeróbio, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano, o reator foi operado em bateladas sequenciais sob baixa concentração de oxigênio dissolvido (0,1mg/L – 0,5mg/L) para promover a oxidação biológica parcial de sulfeto a enxofre. O reator foi operado em ciclos de 24 horas divididas nas etapas de: enchimento (12 minutos), reação (23,6 horas) e descarga (12 minutos). Nessas condições, a eficiência de remoção de sulfeto atingiu 88% e os resultados do estudo mostraram que 20% do sulfeto foram oxidados a sulfato, enquanto que 68% foram oxidados parcialmente a enxofre elementar.

Krishnakumar *et al.* (2005) realizaram estudos em um reator RFLR (*Reverse Fluidized Loop Reactor*) destinados à oxidação aeróbia de sulfeto com a finalidade de formação de enxofre elementar. Os autores observaram a formação de enxofre elementar quando a concentração de sulfeto foi acima de 19kgS²⁻/m³.d, houve declínio na produção de sulfato e aumento na produção de enxofre elementar e formação de polissulfetos. Os autores indicaram que houve maior produção de enxofre elementar quando o potencial redox estava entre - 400mV e - 350mV, similar ao observado por Janssen *et al.* (1998) que obtiveram máxima recuperação de enxofre com potencial redox entre -147 mV e -137mV.

Lowacharin e Annachhatre (2010) operaram um reator “airlift” e utilizaram como biomassa o lodo do processo de lodos ativados. No reator, o processo de oxidação biológica de sulfeto foi

investigado sob condições limitantes de oxigênio (0,15 mg/L). O experimento sucedeu-se com aumento gradual do volume de sulfeto que ocasionou conseqüente acréscimo na produção de enxofre elementar ao longo do período experimental. Com carga de sulfeto de 4,0kgS²⁻/m³.d, 90% de enxofre elementar foi produzido no reator.

Em relação a remoção de sulfeto presente no biogás, os micro-organismos autotróficos pertencentes ao gênero *Thiobacillus* têm apresentado grande aplicação (LEDUC e FERONI, 1994; PÉREZ e VILLA, 2004). Fajardo *et al.* (2012) estudaram a remoção de H₂S do biogás e desnitrificação simultânea por *Thiobacillus denitrificans*, em um reator em batelada, com o objetivo de remover nitrato e sulfeto. As cargas aplicadas foram 0,450 kgS²⁻/L.d e 0,450 kgNO₃⁻/L.d e nestas condições, a eficiência de remoção de sulfeto foi 100% e de nitrato foi 67%. Em outro estudo realizado em sistemas de tratamento de esgoto, *Thiomicrospira denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* e *Beggiatoa* foram os micro-organismos responsáveis pela oxidação anaeróbia do sulfeto na presença de nitrato (ZHANG *et al.*, 2008).

Além disso, há processos patenteados pela PAQUES tal como o THIOPAC que promove a remoção de sulfato e de metais pesados do efluente combinando em um reator o processo anaeróbio (que produz H₂S pela ação das bactérias redutoras de sulfato) e em outro reator, a oxidação biológica de sulfeto a enxofre elementar por uma sulfobactéria incolor do gênero *Thiobacillus* sp. Entretanto, a desvantagem desse processo é o elevado custo para implantação (MUYZER *et al.*, 2008).

Diante das vantagens da utilização de sulfobactérias para remoção de sulfeto, o estudo em escala de bancada realizado por Neto *et al.*, 2009, com espuma de reator UASB, demonstrou potencial de remoção biológica de sulfeto. A observação microscópica da espuma testada, revelou a presença de bactérias envolvidas na oxidação de sulfeto com morfologia semelhante a *Beggiatoa* e *Thiotrix*.

A tabela 2.2 apresenta um resumo dos trabalhos citados nesta literatura referente a remoção de sulfeto. A principal limitação destes trabalhos é que poucos destes estudos quantificaram o enxofre elementar, ou seja, consideraram a formação deste por meio de uma conversão no qual o sulfeto removido que não foi convertido a sulfato, foi considerado enxofre elementar. Portanto, essa limitação dificulta a verificação da viabilidade técnica da recuperação do enxofre elementar.

Além disso, conforme descrito nesta revisão de literatura, a oxidação biológica de sulfeto é comumente realizada utilizando reatores em escala de bancada, com meio sintético e culturas puras como inóculo. Nesse sentido, torna-se fundamental a realização de trabalhos que utilizem reatores que propiciem a remoção de sulfeto e recuperação do enxofre elementar de efluentes que não sejam sintéticos.

Tabela 2.2 - Caracterização de reatores biológicos utilizados para remoção de sulfeto.

Especificação do reator	Tempo de detenção hidráulica (h)	Biomassa (suspensa ou imobilizada)	Concentração de oxigênio dissolvido (mg/L)	Carga de sulfeto (kg S ²⁻ / m ³ .d)	Eficiência de remoção de sulfeto (%)	Recuperação de S ⁰ e/ou produção de SO ₄ ²⁻ (%)	Referência
Reator anaeróbio com colunas	24	Biomassa suspensa (<i>Chlorobium</i> e <i>Rhodospseudomonas</i>)	NA	0,107	95	95 (SO ₄ ²⁻)	Kobayashi <i>et al.</i> (1983)
Reator em batelada	24	Biomassa suspensa (<i>Thiobacillus neapolitanus</i>)	1,0	1,7	100	100 (SO ₄ ²⁻) 75 (S ⁰)	Janssen <i>et al.</i> (1995)
Biorreator anaeróbio em escala de bancada	24	Biomassa imobilizada (<i>Chlorobium limicola</i>)	NA	0,0016	99,5	Não mencionado	Ferrera <i>et al.</i> (2004)
Reator de leito fluidificado (RFLR) em batelada	1,5	Biomassa suspensa (<i>Thiobacillus denitrificans</i>)	Não mencionado	19	100	3 (SO ₄ ²⁻) 80 (S ⁰)	Krishnakumar <i>et al.</i> (2005)
Reator aeróbio em bateladas sequenciais	24	Biomassa imobilizada (espuma de poliuretano)	0,5	0,134	88	20 (SO ₄ ²⁻) 68 (S ⁰)	Silva <i>et al.</i> (2005)
Reator airlift	4	Biomassa suspensa (lodo ativado)	0,15	4,0	90	90 (S ⁰)	Lohwacharin e Annachhatre, (2010)
Reator anaeróbio em batelada	24	Biomassa suspensa (<i>Thiobacillus</i> sp.)	NA	0,450	100	100 (SO ₄ ²⁻)	Fajardo <i>et al.</i> (2012)

NA – Não se aplica

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a remoção biológica de sulfeto em dois reatores alimentados com efluente anaeróbio contendo sulfeto dissolvido e verificar o potencial de recuperação de enxofre elementar.

3.2 *Objetivos específicos*

- 1- Avaliar se a configuração dos reatores, similar ao decantador de reator UASB, favorecerá o desenvolvimento de bactérias oxidadoras de sulfeto.
- 2- Comparar a eficiência de remoção de sulfeto e produção de enxofre elementar entre os dois reatores, quando operados na ausência de meio suporte ou contendo meio suporte distintos.
- 3- Determinar a melhor condição operacional dos reatores para remoção biológica de sulfeto e produção de enxofre elementar.
- 4- Caracterizar a comunidade microbiana desenvolvida nos reatores nas diferentes condições operacionais.

4 HIPÓTESES

- 1- A configuração do reator similar a um decantador de reator UASB, contendo meio suporte, propicia maior retenção de micro-organismos capazes de realizar a oxidação biológica de sulfeto.

Premissa: Os estudos anteriores realizados por Souza et al. (2006) e de Garcia et al.(2012), que verificaram o potencial de remoção biológica de sulfeto a partir da espuma formada no decantador de reator UASB, influenciaram na proposta de uma nova configuração dos reatores, similar ao decantador de reator UASB, contendo meio suporte, que pode favorecer maior retenção dos micro-organismos e maior contato dos mesmos com o efluente, favorecendo a oxidação biológica de sulfeto.

- 2- Os maiores tempos de detenção hidráulica nos reatores contendo meio suporte propiciam maior eficiência de oxidação de sulfeto e produção de enxofre elementar, quando comparado com os reatores operados com menor tempo de detenção hidráulica.

Premissa: O elevado tempo de detenção hidráulica associado à formação de um biofilme/escuma nos reatores pode favorecer o maior contato das sulfobactérias com o sulfeto dissolvido no efluente do reator UASB, permitindo assim alta eficiência de oxidação do sulfeto e produção de enxofre elementar.

3- A produção de enxofre elementar ocorre nos reatores alimentados com efluente de reator UASB, ainda que este contenha baixa concentração de sulfeto dissolvido.

Premissa: Os reatores mantidos fechados propiciam condições anaeróbias e a incidência de luz nos mesmos favorece o crescimento de sulfobactérias fototróficas anoxigênicas. Assim, ainda que o afluente dos reatores contenha baixas concentrações de sulfeto dissolvido, as sulfobactérias fototróficas serão capazes de oxidar o sulfeto dissolvido e produzir enxofre elementar.

4- O reator contendo biobob como meio suporte apresenta melhor desempenho na remoção de sulfeto e produção de enxofre elementar, quando comparado com o reator sem meio suporte ou com anéis plásticos.

Premissa: O meio suporte propicia a retenção dos micro-organismos e assim, maior contato das sulfobactérias com o sulfeto dissolvido no efluente do reator UASB, quando comparada com o reator sem meio suporte, no qual a biomassa cresce de forma dispersa. No biobob, devido a maior área superficial, permite maior retenção dos micro-organismos e uma vez que a transferência de oxigênio é limitada entre os interstícios, propicia a oxidação biológica de sulfeto a enxofre elementar.

5- A redução do tempo de detenção hidráulica influencia na composição da comunidade microbiana dos reatores.

Premissa: Os reatores mantidos fechados favorece o crescimento de micro-organismos anaeróbios que geralmente apresentam crescimento lento, portanto, o maior tempo de detenção hidráulica é a condição mais favorável para o desenvolvimento desses micro-organismos e uma vez que ocorra a redução do TDH, aumenta o risco dessas bactérias serem carregadas para fora do reator devido a maior vazão no reator.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aparato e procedimento experimental

Neste estudo, o aparato experimental utilizado correspondeu a um reator UASB em escala piloto de fibra de vidro, com volume total de 340L, Ø 30cm, h=400cm, e dois reatores de fibra de vidro e cobertura de acrílico, cada um com volume de 25L, Ø 35cm, h=40cm, destinados à remoção de sulfeto dissolvido do efluente do reator UASB, tratando esgotos sanitários. Os três reatores estão instalados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da UFMG/COPASA, situado na Estação de Tratamento de Esgoto do Arrudas, em Belo Horizonte-MG (Figura 5.1).

Após o esgoto bruto ser submetido ao tratamento preliminar, uma pequena fração era direcionada para o reator UASB e, posteriormente, o efluente do UASB prosseguia para os

dois reatores, para remoção do sulfeto dissolvido. A figura 5.1 mostra o desenho esquemático dos reatores, cuja configuração era similar ao decantador de um reator UASB.

Figura 5.1 - Imagem do aparato experimental usado nesse estudo constituído pelo reator UASB em escala piloto e por dois reatores destinados a remoção biológica de sulfeto (R1 e R2).



A composição do esgoto bruto e do efluente do reator UASB utilizado neste estudo estão apresentados na Tabela 5.1.

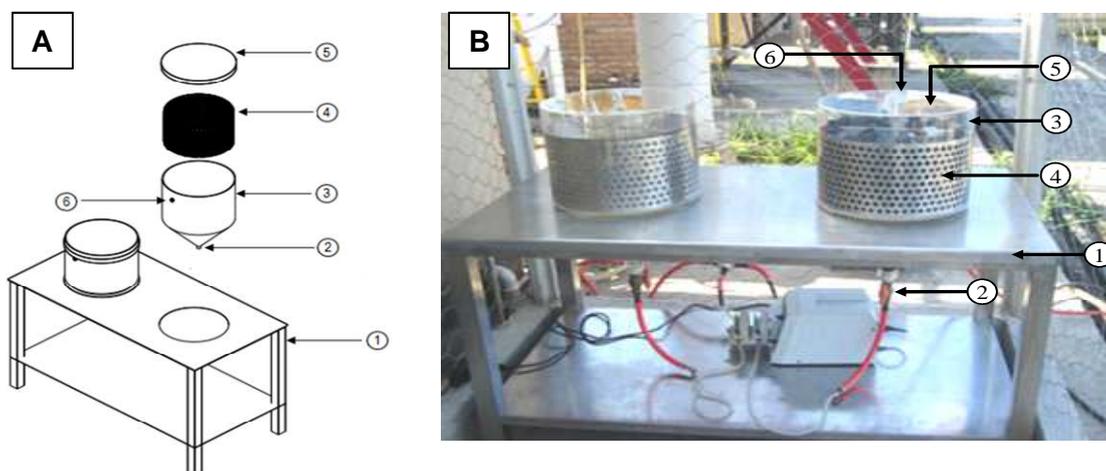
Tabela 5.1 - Composição do esgoto bruto e do efluente anaeróbio proveniente do reator UASB.

<i>Parâmetros</i>	<i>Composição do esgoto bruto (mg/L)</i>	<i>Composição do efluente anaeróbio (mg/L)</i>
DQO	374 – 431	181– 193
S ²⁻	0,8 – 4,3	1 – 6
SO ₄ ²⁻	17,4 – 55,9	5 – 25
N-amoniacoal	22 – 37	29 – 47

A proposta de configuração dos dois reatores utilizados na pesquisa foi similar a um decantador de reator UASB, nas seguintes características: formato do reator com fundo em

forma de cone e o modo de operação com fluxo ascendente do efluente anaeróbico. Os principais constituintes dos reatores podem ser visualizados na figura 5.2.

Figura 5.2 - Desenho esquemático (a) e fotografia (b) do aparato experimental. Os componentes dos reatores estão numerados: (1) mesa suporte dos reatores, (2) entrada do afluente, (3) reator (4) cesto interno para preenchimento com meio suporte (5) tampa transparente (6) saída do efluente.



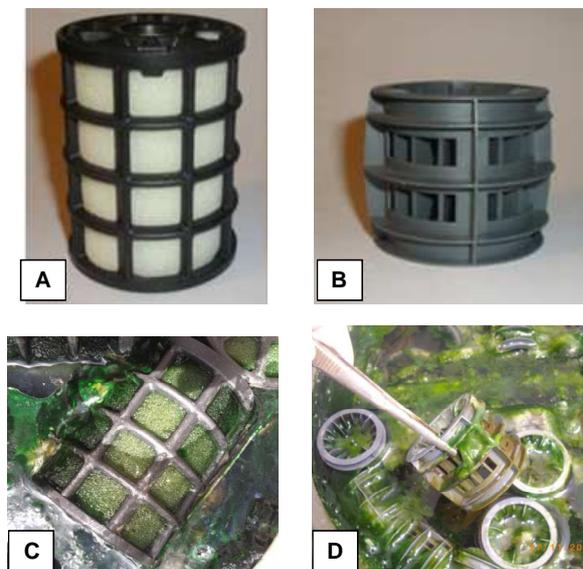
Na câmara cilíndrica dos reatores, o cesto interno foi projetado para manter o material de enchimento no reator e permitir a retenção de micro-organismos presentes naturalmente no efluente anaeróbico e as perfurações do cesto permitia a passagem do líquido para o interior do cesto. Os reatores foram construídos com material transparente, a fim de proporcionar o crescimento de bactérias oxidadoras de sulfeto que crescem na presença de luz, e selados com silicone a fim de manter condições anaeróbias. A tabela 5.2 apresenta as principais características dos reatores propostos para remoção de sulfeto de efluente anaeróbico.

Tabela 5.2 - Características dos principais componentes dos reatores R1 e R2.

Características	Unidade	Câmara cilíndrica	Cone
Diâmetro interno	cm	35	Variável
Altura	cm	30	20
Volume	L	25	-

O monitoramento dos reatores ocorreu durante 515 em três fases operacionais distintas, representadas por três tempos de detenção hidráulica (TDH) distintos, dos quais 8 meses de monitoramento foram com TDH de 24h, 5 meses com TDH de 12h e 4 meses com TDH de 6h (tabela 5.3). Na fase 1, os reatores foram operados na presença e ausência de material suporte e nas fases 2 e 3, os reatores foram operados com meios suportes diferentes, conforme mostra a figura 5.3.

Figura 5.3 - Imagem do meio suporte utilizado como material de enchimento nos reatores. (a) Biobob (b) Anel de polipropileno (c) e (d) biofilme formado no biobob e no anel plástico, respectivamente.



O material suporte utilizado nesse estudo foi anel de polipropileno (\varnothing 45mm, h= 35mm e $86\text{m}^2/\text{m}^3$ de área superficial) e o biobob (BIOPROJ, Environmental Technology Ltd., Brazil), constituído por espuma de poliuretano envolta por polipropileno (\varnothing 45mm, h= 60mm e $270\text{mil m}^2/\text{m}^3$ de área superficial) conforme mostra a tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Fases operacionais e características dos reatores.

Fase operacional	TDH	Duração	Média do fluxo do líquido nos reatores(m^3/d)	Meio suporte do reator 1 (R1)	Meio Suporte do reator 2 (R2)
Fase 1	24h	8 meses	0,03	230 anéis plásticos	Controle*
Fase 2	12h	5 meses	0,06	230 anéis plásticos	90 biobob
Fase 3	6h	4 meses	0,12	230 anéis plásticos	90 biobob

*reator sem meio suporte

Na fase 1, com duração de oito meses, o R1 foi comparado com o segundo reator, denominado de R2 (controle), sem meio suporte, e ambos foram operados com TDH de 24h e vazão média de 30L/d. Estas condições foram determinadas com intuito de proporcionar máximo crescimento da biomassa, além de permitir comparar a diversidade microbiana entre

os reatores (R1: biomassa aderida e R2: biomassa dispersa) e verificar a influência do suporte na eficiência de remoção de sulfeto.

Posteriormente, os reatores foram desativados e uma nova partida foi realizada, iniciando a fase 2 em que o R1 foi preenchido com anéis de polipropileno e o R2 foi preenchido com biobob. Os reatores foram operados durante cinco meses, com TDH de 12h e vazão média de 60L/d e posteriormente, prosseguiu-se para fase 3, período em que os reatores foram operados durante quatro meses no TDH de 6h, com vazão média de 120L/d. Nas fases 2 e 3, o objetivo foi avaliar a influência do tipo de material suporte na retenção de micro-organismos oxidadores de sulfeto e verificar se a redução do TDH influenciaria na remoção de sulfeto e na diversidade microbiana formada nos biofilmes.

Ressalta-se que os reatores não foram inoculados, a comunidade microbiana presente no próprio efluente anaeróbico se desenvolveu naturalmente dentro dos reatores durante o período de monitoramento. Os dois reatores foram operados em fluxo contínuo e alimentados com efluente anaeróbico contendo baixas concentrações de sulfeto dissolvido (cerca de 1 a 6mg/L).

Com relação a coleta de biomassa dos reatores, na fase 1 a tampa dos reatores era retirada para coleta dos anéis plásticos no R1-24h e no R2-24h (controle), a espuma que se formou na superfície do reator era removida com auxílio de uma espátula. Nas fases 2 e 3 foram feitas duas perfurações na tampa dos reatores que permitia a retirada do material suporte de forma aleatória. A coleta do afluente, nas três fases operacionais, foi realizada sempre no mesmo dispositivo de entrada, na qual a alimentação dos reatores era interrompida. Com relação ao descarte de lodo, o mesmo foi realizado no encerramento da fase 1, enquanto que nas fases 2 e 3, o descarte do lodo foi feito duas vezes em cada fase operacional.

5.2 Análises físico-químicas

As seções a seguir descrevem os procedimentos analíticos utilizados neste estudo. A tabela 5.4 apresenta os parâmetros monitorados, bem como os métodos utilizados para as respectivas análises físico-químicas de sulfeto, sulfato, tiosulfato, enxofre elementar, série de sólidos, pH e potencial redox, sendo que para a medição destes dois últimos, a sonda do pHmetro era introduzida no interior dos reatores.

Tabela 5.4 - Parâmetros, métodos analíticos, frequência e pontos de amostragem.

Parâmetro	Método	Frequência	Ponto de amostragem	Referência
Sulfeto (S^{2-})	Iodométrico	Duas vezes por semana	Afluente e efluente	APHA <i>et al.</i> (2012)
Sulfato (SO_4^{2-})	Turbidimétrico	Duas vezes por semana	Afluente e efluente	APHA <i>et al.</i> (2012)
Tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$)	Turbidimétrico	Duas vezes por semana	Afluente e efluente	APHA <i>et al.</i> (2012)
Enxofre elementar (S^0)	Cromatografia líquida	Semanalmente Mensalmente	Afluente e efluente Biomassa dos reatores	Henshaw <i>et al.</i> (1998) Lauren e Watkinson (1985)
Série de Sólidos (ST, STV)	Gravimétrico	Mensalmente	Afluente, efluente e lodo	APHA <i>et al.</i> (2012)
pH e potencial redox	Potenciométrico	Duas vezes por semana	Afluente e efluente	APHA <i>et al.</i> (2012)

5.2.1 Sulfeto

Na determinação da concentração de sulfeto dissolvido, o método utilizado foi o iodométrico. As análises foram feitas em triplicata e antes da determinação da concentração do sulfeto dissolvido, foi necessário remover a matéria insolúvel, segundo APHA (2012).

O referido método determina que a remoção da matéria insolúvel deve ser feita adicionando cloreto de alumínio (5,2077 mol/L), para clarificar o sobrenadante para análise. Assim, realizou-se este procedimento e em seguida, após transferir o sobrenadante para outro frasco, adicionou-se nas amostras as soluções de acetato de zinco e hidróxido de sódio 6N, o que conduziu a formação de um precipitado branco, sulfeto de zinco.

A equação 5.1 representa o processo descrito anteriormente, com a formação do precipitado sulfeto de zinco.



Após a formação do precipitado, as amostras foram submetidas à centrifugação por 30s a 4000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um erlenmeyer no qual adicionou-se água, iodo 0,025N, ácido clorídrico 6N e amido. Em seguida, procedeu-se a titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,025N.

Para determinação da concentração de sulfeto dissolvido nas amostras utilizou-se a equação 5.2.

$$\text{mg/L} = \frac{[(A.B) - (C.D)].1600}{\text{volume da amostra}}$$

Onde:

A = Volume (mL) da solução de iodo;

B = Concentração (N) da solução de iodo;

C = Volume (mL) da solução de tiosulfato de sódio;

D = Concentração (N) da solução de tiosulfato de sódio.

Além do sulfeto dissolvido, no ponto de saída do efluente dos reatores foi medido o sulfeto gasoso, para isso, utilizou-se um medidor de H₂S (OdaLog) na faixa de 0-200ppm.

5.2.2 Sulfato

A concentração de sulfato foi medida utilizando o método turbidimétrico (APHA, 2012) e foi feito com amostras em triplicata. O princípio desse método baseia-se na precipitação do íon SO₄²⁻ em meio ácido acético com cloreto de bário (BaCl₂), formando cristais uniformes de sulfato de bário (BaSO₄) (equação 5.3). A absorvância da suspensão de BaSO₄ foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm e a concentração de SO₄²⁻ foi determinada segundo uma curva padrão.



5.2.3 Tiosulfato

Para realização da análise de tiosulfato foram coletados 50mL de amostra, em triplicata, e para remoção de sólidos suspensos, duas gotas de NaOH e AlCl₃ eram adicionados, o preparo dessas soluções foi segundo APHA (2012). Posteriormente, foram transferidos 20 mL de amostra para um novo frasco e adicionava-se 0,5 mL de NH₄ concentrada e 2 mL de H₂O₂, depois a amostra foi fervida para evaporação do excesso de NH₄. Após essa etapa, o tiosulfato foi convertido a sulfato e prosseguiu-se para mesma metodologia utilizada para análise de sulfato, conforme APHA (2012).

5.2.4 Enxofre elementar

O enxofre elementar foi extraído das amostras com clorofórmio e quantificado por cromatografia líquida (HPLC) com coluna PRP1 de fase reversa (15cm X 4.1mm) segundo especificação de Lauren e Watkinson (1985) e Henshaw *et al.* (1998).

Para determinação do enxofre elementar presente na espuma, biofilme e lodo dos reatores, foi necessário realizar etapa prévia de lise celular. Nessa etapa, 2mL das amostras eram transferidas para um tubo contendo 0,2g de micropérolas de vidro e os tubos foram levados ao microdesmembrador e agitados por 1 minuto a 4000 rpm. Após este procedimento, o enxofre elementar foi extraído das amostras com clorofórmio.

As análises estatísticas foram feitas para os parâmetros sulfeto, sulfato, tiosulfato e S^o e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($\alpha = 5\%$) foi utilizado para comparação múltipla entre os reatores no software Statistica 8.

5.2.5 Série de sólidos, pH e potencial redox.

A análise de sólidos foi feita por meio do método gravimétrico conforme APHA (2012). A coleta de 50 mL de lodo nos reatores foi feita por meio do dispositivo de descarte do lodo, na parte inferior do reator. Para coleta do biofilme dos reatores com material suporte, 5 anéis plásticos eram coletados de forma aleatória ao longo da altura do reator e lavados com 500 mL de PBS 1X, a partir deste volume eram retirados 50mL para análise de sólidos.

O equipamento utilizado na medição do pH e potencial de oxido-redução foi o pHmetro (Modelo UB-10, Denver Instruments) com eletrodo combinado de platina com referência Ag/AgCl (Modelo DMR-CP1, Digimed).

5.3 Análises microbiológicas

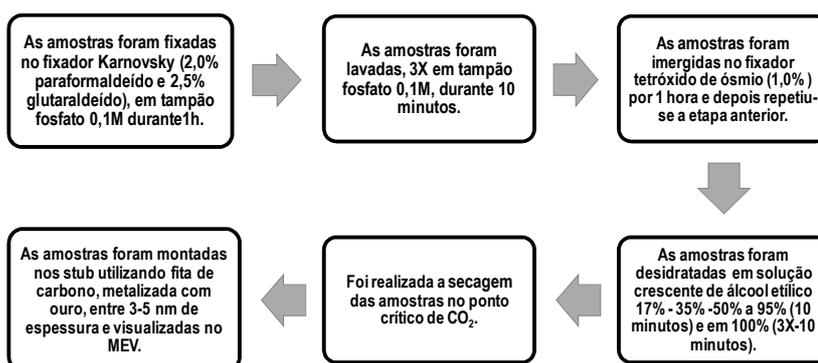
5.3.1 Análises microscópicas: Microscopia comum e eletrônica de varredura (MEV) com EDX da biomassa dos reatores.

As amostras de biofilme dos reatores nas três fases operacionais, espuma e lodo do R2-24h (controle) foram coletadas mensalmente e as morfologias predominantes foram observadas por microscopia óptica comum em microscópio binocular (Olympus, modelo BX-50, com câmara Olympus DP70). No R2-24h (controle), 1mL de espuma e 1mL lodo era retirado para

análise de microscopia comum, sendo que a coleta de lodo nesse reator era feita por meio do dispositivo de descarte, na parte inferior do reator. Enquanto que nos reatores que foram preenchidos com material suporte, eram coletados 5 unidades de meios suportes e o biofilme era desprendido com lavagem do meio suporte com 500 mL de tampão fosfato salino (NaCl 0,13 M; Na₂HPO₄ 7,0 mM; NaH₂PO₄; 3,0 mM; pH 7,2) e 1mL de biofilme era retirado para observação no microscópio.

O mesmo procedimento de lavagem foi feito nas amostras do biofilme do R1 e R2 nas fases operacionais 2 e 3 (TDH de 24h e 12h) para análise no MEV-EDX. O material removido foi fixado (2,0% paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído), lavado (em tampão fosfato 0,1M) e desidratado com etanol de acordo com o protocolo do Centro de Microscopia da UFMG (figura 5.4). As amostras foram metalizadas com ouro e posteriormente foram visualizadas em microscópio eletrônico (FEG - Quanta 200 FEI) com espectrometria de energia dispersiva de raio X, para determinação da presença de enxofre na biomassa dos reatores.

Figura 5.4 - Etapas da preparação das amostras para visualização no MEV.



5.3.2 Extração de DNA

Para determinar a diversidade microbiana presente na biomassa dos reatores R1 e R2, nas diferentes fases operacionais (fase 1: TDH=24h e fase 2:TDH=12h), bem como na espuma do decantador do reator UASB utilizado nesse estudo, foi realizada as etapas de extração de DNA, seguida pela PCR-DGGE.

A coleta da espuma do decantador do reator do UASB foi feita no início da operação dos reatores, em outubro/2012. A periodicidade da coleta de biofilme nos reatores R1 e R2, no TDH de 24h, foi no início de operação dos reatores, com 123 dias e 243 dias de operação, enquanto que no TDH de 12h, a periodicidade foi com 31 dias e 92 dias de operação.

Para coleta das amostras de biofilme dos reatores foram coletados 5 unidades de meio suporte e o biofilme era desprendido com lavagem do meio suporte com 500 mL de tampão fosfato salino (NaCl 0,13 M; Na₂HPO₄ 7,0 mM; NaH₂PO₄; 3,0 mM; pH 7,2). Com relação a coleta de espuma do decantador do reator UASB, toda espuma do decantador foi removida, totalizando-se o volume de 170mL de espuma.

Posteriormente, todas as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 10 minutos e após descarte do sobrenadante foi adicionado 1,0 mL de Tampão Fosfato (120mM Na₂HPO₄: pH 8,0), esse procedimento foi realizado novamente com as amostras e posteriormente, 2mL de cada amostra foram utilizados diretamente no protocolo de extração, segundo Egli *et al.* (2003) cujo procedimento foi feito em triplicata para cada amostra dos reatores.

Para verificação do resultado da extração de DNA, alíquotas de 2,0µL das amostras extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% a 75 Volts por 45 minutos. Para avaliar o tamanho dos ácidos nucléicos extraídos, utilizou-se o Ladder Express como marcador de peso molecular. Posteriormente, os géis foram corados com GelRed, observados em um transiluminador de luz UV e as imagens foram registradas por um sistema de captura de imagem. A medição da concentração de DNA extraída das amostras dos reatores foi realizada em espectrofotômetro de ácidos nucleicos.

5.3.3 Reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel de gradiente desnaturante

Após a extração do DNA total da comunidade microbiana, presente nas amostras dos reatores, foi realizada a amplificação do gene RNAr 16S por meio da técnica de PCR. Neste estudo, foi utilizado o par de iniciadores 1055F e 1392R (tabela 5.5) que delimita a região universalmente conservada entre os micro-organismos do Domínio *Bacteria* (posições 1055-1070 e 1392-1406, baseado no RNAr 16S de *Escherichia coli*). Para a análise de DGGE o iniciador 1392R utilizado, continha grampo GC, conforme descrito por Ferris *et al.* (1997).

Tabela 5.5 - Principais características do par de iniciadores usado na PCR-DGGE.

Gene alvo	Par de Iniciadores	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
Região v8 do gene RNAr 16S	1055F 1392R-GC	ATGGCTGTCGTCAGCT [GC]*ACGGGCGGTGTGTA C	337	56	Ferris <i>et al.</i> (1997)

[sequência grampo GC]*= CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC

O detalhamento das temperaturas e os períodos utilizados no programa da PCR estão apresentados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Descrição do programa usado no termociclador para as reações de amplificação do gene RNAr 16S com o par de iniciadores 1055F-1392R-GC.

Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Resfriamento
94°C	94°C	56°C	72 °C	72 °C	4°C
4 minutos	1 minuto	1 minuto	1 minuto	10 minutos	-
x 35 ciclos					

Os reagentes necessários, as concentrações e o volume dos mesmos, para uma reação de PCR com volume final de 50µL, estão apresentados na tabela 5.7. Todas as reações de PCR foram realizadas juntamente com um controle, ausente de amostra de DNA.

Tabela 5.7 - Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR.

Reagente	Marca	Concentração estoque	Concentração por reação	Volume para reação de 50 µL
Água ultra-pura	Samtec Biotecnologia	-	-	37,35µL
Tampão PCR (contendo MgCl ₂)	<i>Phonetrria</i>	10X	1X	5 µL
dNTPs ⁽¹⁾	<i>Fermentas</i>	25 mM cada	200 µM cada	0,4 µl
Iniciadores	<i>Fermentas</i>	30pmol/ µL (cada iniciador)	300nM(cada iniciador)	0,5 µL (cada iniciador)
BSA ⁽²⁾	<i>Sigma</i>	2,5mg/L	600ng	3,0µl
<i>Taq polimerase</i>	<i>Phonetrria</i>	5U/µL	0,025U/MI	0,25 µl
Amostra de DNA	-	-	-	3 µL

⁽¹⁾ dNTPs - nucleotídeos; ⁽²⁾ BSA - albumina de soro bovino.

Após a realização da PCR com as amostras extraídas dos reatores, foi aplicado 2µl dos produtos de PCR no gel de agarose 1% e 2µL do marcador de peso molecular (*Low Mass Ladder* -Invitrogen), como padrão de referência para quantificação de DNA.

Posteriormente, as imagens dos géis de agarose digitalizadas foram analisadas no programa ImageJ(http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:analysis:gel_quantification_analysis),

no qual estimou-se a área da intensidade da banda (em pixels) de referência (*Low Mass Ladder*) e das amostras do gel. No programa ImageJ, com os valores das respectivas áreas do *Low Mass Ladder* foi estimado 400ng de DNA para cada amostra que seria aplicada na canaleta do gel de DGGE.

Os produtos resultantes da amplificação da PCR foram adicionados em géis de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida) contendo agentes desnaturantes (uréia e formamida) para separação dos diferentes fragmentos de DNA. O gel de DGGE continha 8% de poliacrilamida e gradiente desnaturante de 50% a 65%. O DGGE foi realizado nas seguintes condições: temperatura de 60 °C, 75V, durante 16,5 horas no tampão TAE 0,5X (TAE 1X: 0,04M Tris base; 0,02M Acetato de sódio; 10 mM EDTA; pH ajustado para 7,4) no sistema DCode (Bio-Rad Universal Mutation Detection, Hercules, CA, USA).

Posteriormente, os géis foram corados com solução SYBR Gold (30 µL de corante 10.000X em 300 mL de tampão TAE 0,5X) e visualizados sob luz ultravioleta. As bandas observadas na luz ultravioleta foram excisadas e transferidas para microtubos de 2,0mL contendo 50 µL de TE, as bandas eram mantidas a -20°C, para permitir a eluição do DNA retido na matriz do gel para a fase líquida. Posteriormente, foi realizada outra PCR com os par de iniciadores 1055F-1392R (sem calda GC) utilizando 2µl da banda que foi eluída em TE. Os produtos da PCR eram purificados com etanol e o produto era ressuscitado em 10 uL de água ultra pura.

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados usando o serviço genômica da Macrogen Inc.(Coréia do Sul). As sequências foram comparadas com aquelas presentes no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) do NCBI (*National Center of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e suas respectivas posições taxonômicas foram obtidas pela ferramenta de busca do National Centre for Biotechnology Information e o Ribosomal Database Project (RDP) classifier (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

O perfil obtido no gel de DGGE, contendo as amostras dos reatores R1 e R2, nos TDH de 24h e 12h, foi analisado usando o BioNumerics software versão 6.6 (Applied Maths, Bélgica). O perfil das amostras no gel foi comparado usando o coeficiente de similaridade Dice, com tolerância de 1% e o dendrograma foi construído utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group with mathematical Averages).

Segundo Gafan *et al.* (2005), o índice mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá uma banda escolhida, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N bandas. Portanto, para análise de diversidade do DGGE das amostras dos reatores utilizou-se o índice de Shannon (H'), que foi calculado conforme equação abaixo:

$$H = - \sum [n_i/N \log(n_i/N)]$$

Onde n_i representou a intensidade de bandas individuais e N foi a soma da intensidade de todas as bandas.

5.3.4 Pirosequenciamento

A técnica de pirosequenciamento foi utilizada para análise da composição da comunidade microbiana presente nas amostras dos reatores 1 e 2, nos TDH de 24h e 12h. A extração de DNA foi conforme Egli *et al.* (2003) e o DNA foi purificado com o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). O DNA total foi estimado utilizando o Espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies®, Wilmington, DE, USA).

O DNA foi precipitado em etanol 95% e seco à 50°C. Posteriormente, as amostras desidratadas foram enviadas para o Instituto de Agrobiotecnologia de Rosario (INDEAR, Santa Fe, Argentina) onde o pirosequenciamento foi realizado utilizando o equipamento 454 GS-FLX (Life Sciences, Roche). Para realização do pirosequenciamento foram utilizados *barcodes* com 10 pares de bases, além dos *tag* e iniciadores designados para cada amostra, conforme mostra a tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Barcode de referências das amostras dos reatores 1 e 2, nos TDH de 24h e 12h.

Amostras	Barcode	Tag + iniciador forward (515F)	Iniciador Reverse (806R)
R1-24h	TCGAGCTCTC	CACGACGTTGTAAA	CAGGAAACAGCTATG
R2-24h	TCTGTCTCGC	ACGACGTGCCAGCM	ACCGGACTACVSGGG
R1-12h	TCGCAGACAC	GCCGCGGTAA	TATCTAAT
R2-12h	TGAGTGACGC		

Os genes RNAr 16S foram amplificados e o par de iniciadores utilizados para a região V4 foram: 515F, no qual uma sequência adaptadora (*tag*) foi incluída e o iniciador 806R. As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) (CAPORASO *et al.*, 2010). As sequências com comprimento inferior a 200pb, coeficiente de qualidade menor que 25, homopolímeros de tamanho maior que 6 e bases ambíguas foram removidas. Para a definição das unidades operacionais

taxonômicas (*Operational taxonomic units* – OTUs), utilizou-se o algoritmo UCLUST (EDGAR, 2010) adotando-se similaridade de 97%. Em seguida, as sequências foram classificadas usando-se a ferramenta *Ribomossal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

Os índices de diversidade alfa determinados foram Shannon, Dominância e Equitabilidade, enquanto que o índice de diversidade beta utilizado foi o Bray-Curtis. Todos os índices foram calculados utilizando o software Past (versão 3.0). A curva de rarefação das amostras foi determinada usando a ferramenta Excel.

6 RESULTADOS

6.1 Desempenho dos reatores de oxidação biológica de sulfeto

6.1.1 Relação entre pH e potencial redox do afluente e do efluente dos reatores

A estrutura da comunidade microbiana responsável pela oxidação de sulfeto é influenciada pelas condições que prevalecem no ambiente, tais como: pH, temperatura, concentrações de sulfeto e sulfato, potencial redox, disponibilidade de luz e matéria orgânica (ELSHAHED *et al.*, 2003).

O pH determina a presença de polissulfetos, que são formados pela interação entre enxofre e soluções aquosas de sulfeto. Segundo Chen *et al* (1972), a concentração de enxofre elementar em pH próximo a 6,0 é maior que a de polissulfetos e em pH entre 8,0 e 9,0 ocorre a predominância de polissulfetos.

Uma vez que o pH tem grande influência nas formas de sulfeto que podem estar presentes no sistema, o mesmo foi monitorado ao longo do período de monitoramento dos reatores conforme mostra a tabela 6.1. Além do monitoramento do pH, as medições de potencial redox (tabela 6.1) também foram realizadas.

Tabela 6.1 - Valores médios de pH e potencial redox do afluente e efluente dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.

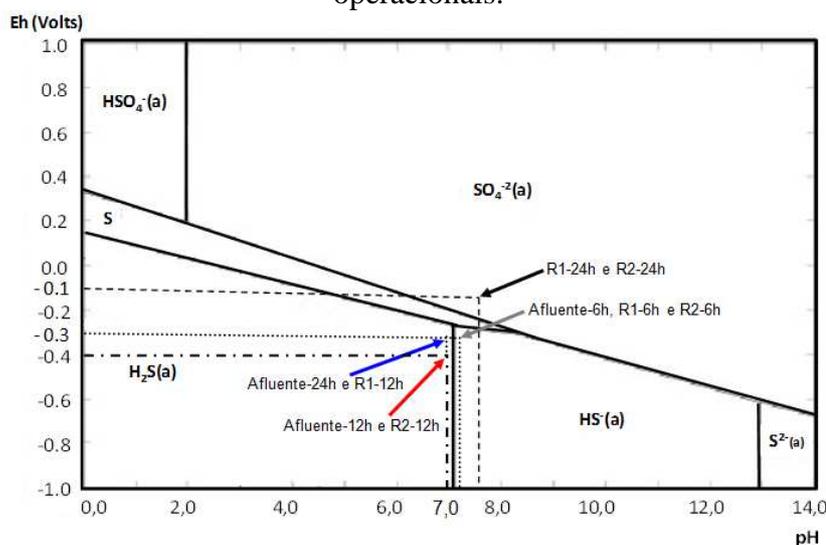
Fase operacional	TDH	Ponto de amostragem	Média pH	Média Potencial redox (Volts)
1	24h	Afluente	7,0	-0,3
		Efluente do R1	7,6	-0,1
		Efluente do R2	7,6	-0,1
2	12h	Afluente	7,0	-0,4
		Efluente do R1	7,0	-0,3
		Efluente do R2	7,0	-0,4
3	6h	Afluente	7,2	-0,3
		Efluente do R1	7,2	-0,3
		Efluente do R2	7,2	-0,3

Buisman *et al.* (1991) demonstraram que a conversão de sulfeto para enxofre elementar é responsável por 70% da perda de sulfeto em reatores com condições anóxicas/anaeróbias, com o pH variando de neutro a alcalino. De acordo com Koydon (2004), o sulfeto presente no sistema pode se apresentar na forma de H₂S volátil, quando o pH está ácido e na forma de HS⁻ sendo essa a forma predominante quando o pH está neutro.

Como pode ser observado na tabela 6.1, os valores médios de pH do afluente e efluente dos reatores nas três fases operacionais permaneceram próximo do neutro, o potencial redox tanto no afluente quanto no efluente dos reatores apresentaram valores negativos que são favoráveis ao crescimento de micro-organismos anaeróbios. Segundo Amim (2008), ambientes com potencial redox elevado (+) são favoráveis à manutenção de micro-organismos estritamente aeróbios, enquanto valores negativos do potencial favorecem o crescimento de micro-organismos estritamente anaeróbios.

Com o intuito de verificar se o enxofre produzido nos reatores é resultante da rota metabólica dos micro-organismos oxidadores de sulfeto, relacionou-se os dados de pH e potencial redox do afluente e efluente de ambos os reatores com o diagrama de Pourbaix, também conhecido como diagrama potencial/pH. Este diagrama é uma representação gráfica das possíveis fases de equilíbrio estáveis de um sistema eletroquímico (GENTIL, 1996). As linhas contínuas representam as fronteiras entre as áreas de estabilidade das várias espécies iônicas de um determinado elemento e portanto, torna-se possível relacionar as diferentes formas de enxofre com base no seu potencial redox e no pH. Na figura 6.1 as linhas tracejadas correspondem aos valores médios de pH e potencial redox e o ponto de associação dos mesmos estão indicados pelas setas.

Figura 6.1 - Diagrama de Pourbaix S/H₂O, considerando algumas espécies de enxofre em relação a faixa de pH e potencial redox do afluente e dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.



Com base no diagrama de Pourbaix, no TDH de 24h, a reação química favorável no afluente foi a formação de H₂S e especificamente nos reatores R1 e R2, a reação química de formação de SO₄²⁻ foi favorecida. Enquanto que no TDH de 12h a reação de formação de H₂S foi favorável quimicamente no afluente e efluente de ambos os reatores e no TDH de 6h, a reação química de formação de HS⁻ foi favorecida no afluente e no efluente dos reatores R1 e R2.

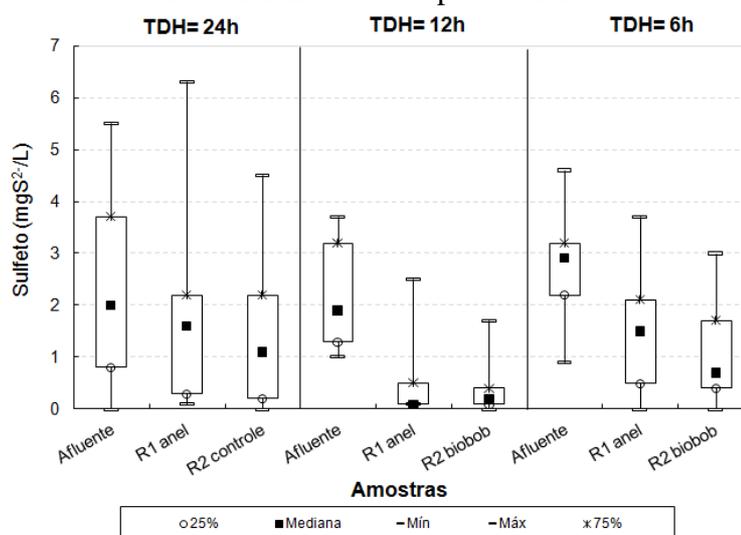
Portanto, uma vez que no diagrama de Pourbaix, a reação química de formação de S⁰ não foi favorecida nos reatores, a produção de enxofre elementar nos reatores, nas três fases operacionais, foi associada ao metabolismo biológico. Segundo Buisman *et al.* (1990), o sulfeto pode ser oxidado biologicamente a sulfato e a enxofre elementar, o qual pode ser acumulado em grânulos intracelulares pelas sulfobactérias e posteriormente oxidado a sulfato.

No estudo realizado por Krishnakumar *et al.* (2005), os autores verificaram que houve maior produção de enxofre elementar quando o potencial redox estava entre -0,4V e -0,3V e Janssen *et al.* (1998) obtiveram máxima recuperação de enxofre com potencial redox entre -0,1V e -0,3V. Portanto, como no presente estudo os valores de potencial redox encontrados foram de -0,3V e -0,4V pode-se concluir que estes valores favoreceram o crescimento de microorganismos anaeróbios nos reatores e que a formação de S⁰ foi proveniente da oxidação biológica de sulfeto a enxofre elementar.

6.1.2 Monitoramento das concentrações de sulfeto, sulfato, tiosulfato e enxofre elementar dos pontos afluente e efluente dos reatores

Os reatores foram monitorados durante 500 dias e três diferentes tempos de detenção hidráulica foram avaliados (fase 1: TDH=24h, fase 2: TDH=12h e fase 3: TDH=6h). Os resultados das determinações de sulfeto (afluente e efluente) durante as três fases operacionais estão apresentadas na figura 6.2

Figura 6.2 -Box-plot das concentrações de sulfeto (afluente e efluente) dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais.



As concentrações de sulfeto dissolvido no afluente dos reatores foram baixas, com valores medianos em torno de 2mg/L nos TDH de 24h e 12h, e 3mg/L no TDH de 6h. Com relação as fases operacionais é possível observar que no TDH de 12h o decaimento de sulfeto foi maior no R1 e R2 quando comparado com os reatores nas demais fases operacionais. Apesar do consumo de sulfeto ter sido maior nos reatores na fase 2, é possível observar que esse consumo também ocorreu nas fases 1 e 3.

A análise estatística com o teste Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$) demonstrou que não houve diferença estatística entre os reatores quanto ao consumo de sulfeto, nas três fases operacionais, indicando que o consumo entre os reatores R1 e R2 foi similar. Contudo, houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) ao comparar os valores de sulfeto do efluente dos reatores com o afluente, nas diferentes fases operacionais.

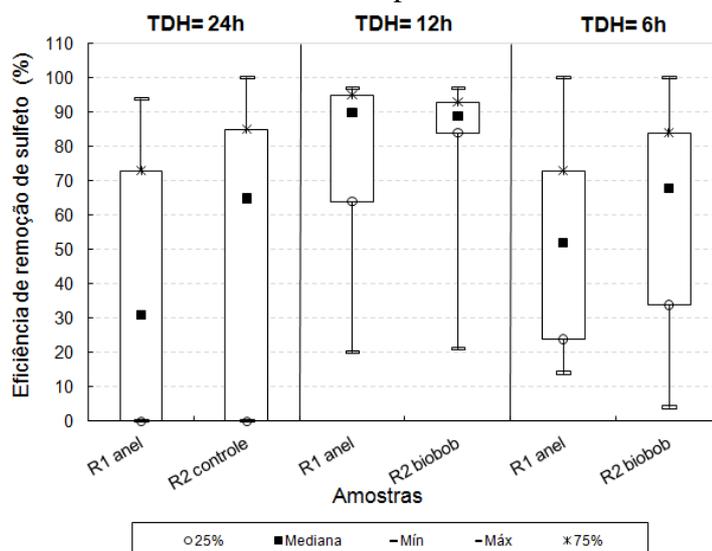
Portanto, analisando o consumo de sulfeto nos reatores, observou-se que as mudanças de TDH tiveram maior influência na remoção de sulfeto do que a presença ou ausência de meio suporte (TDH de 24h) ou o uso de diferentes meios suportes, tais como o anel plástico ou o biobob (TDH de 12h e 6h).

A resolução CONAMA 430/11 apresenta padrões para o lançamento de efluentes nos corpos de água, estabelecendo limites para compostos orgânicos e inorgânicos. Esta resolução estabelece para sulfeto o padrão de 1,0 mg/L. Nesse sentido, foi possível observar que nas três fases operacionais o valor mediano de sulfeto no afluente não atendeu aos limites estabelecidos pela resolução para o lançamento de efluentes nos corpos de água. Enquanto que os valores medianos do efluente dos reatores no TDH de 12h atenderam ao limite estabelecido pela resolução, indicando que os reatores poderiam ser usados no pós-tratamento do efluente do UASB, no que diz respeito a remoção biológica de sulfeto.

Com relação a concentração de sulfeto no headspace dos reatores, os valores determinados estiveram na faixa de 0 a 3ppm, portanto, a perda de sulfeto na forma de H_2S foi considerada desprezível. Segundo Janssen *et al.* (2009), dependendo da carga de sulfato e pH no reator anaeróbio, as concentrações de H_2S no biogás podem variar de algumas centenas de ppms até 2-3% (v / v). Conforme Koydon (2004), o sulfeto pode se apresentar na forma de H_2S volátil, quando o pH está ácido e na forma de HS^- sendo essa a forma predominante quando o pH está neutro. Uma vez que o pH do efluente dos reatores estiveram na faixa de 7,0 a 7,6 (ver item 6.1.1), a maior parte do sulfeto estava na forma dissolvida nos reatores.

Com relação a eficiência de remoção de sulfeto (Figura 6.3) pode-se verificar que (considerando os valores medianos) no TDH de 24h, a eficiência foi maior no R2 (65%) do que no R1 (30%), ou seja, na fase 1 o R2 controle (sem meio suporte) apresentou maior eficiência na remoção de sulfeto.

Figura 6.3 - Eficiência de remoção de sulfeto no afluente e efluente dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais.



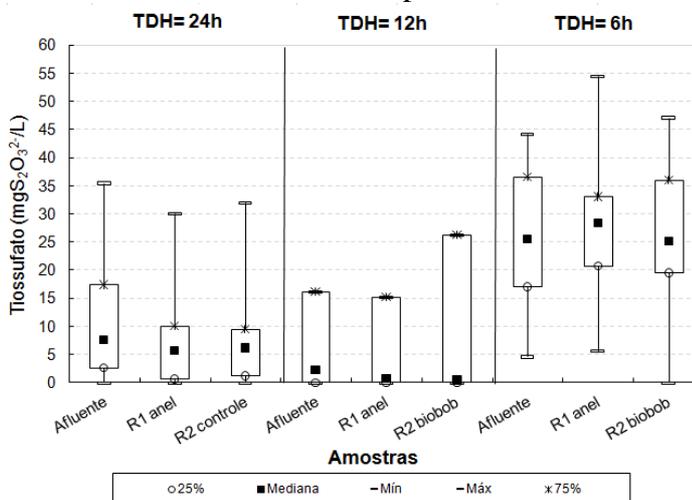
Apesar do R2 (controle) não apresentar meio suporte, foi possível verificar a formação de espuma na superfície do reator, que era uma camada estratificada na qual a parte superior apresentava coloração verde e a parte inferior, coloração púrpura. As análises microscópicas revelaram a presença de bactérias com morfologia semelhante a sulfobactéria púrpura *Chromatium*, que possivelmente poderia estar envolvida na remoção de sulfeto nesse reator.

Estudo conduzido por Siefert *et al.*(1978) indicou resultados similares, o estudo revelou a presença de bactérias fototróficas púrpuras e verdes, dentre as quais a bactéria fototrófica púrpura *Chromatium* foi detectada na amostra de lodos ativados no tratamentos de esgoto.

Quando os reatores, R1 e R2, foram comparados na fase 2 (TDH=12h), ambos apresentaram 90% de eficiência de remoção de sulfeto, portanto, apresentaram eficiências similares, ainda que contendo meio suporte distintos. Enquanto que na fase 3 (TDH=6h) a eficiência de remoção de sulfeto foi maior no R2 (69%) contendo biobob como meio suporte do que no R1 (52%) com anéis plásticos. Contudo, a análise estatística com o teste Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$) demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os reatores nas fases operacionais 1, 2 e 3, indicando que em cada fase operacional, o desempenho dos reatores foi similar quanto a eficiência de remoção de sulfeto. Conforme mostra a figura 6.4, os reatores no TDH de 12h apresentaram a maior eficiência de remoção de sulfeto, com valores medianos de 90%.

Com relação ao monitoramento de tiosulfato nos reatores, a figura 6.4 mostra as concentrações de tiosulfato no afluente e efluente dos reatores R1 e R2.

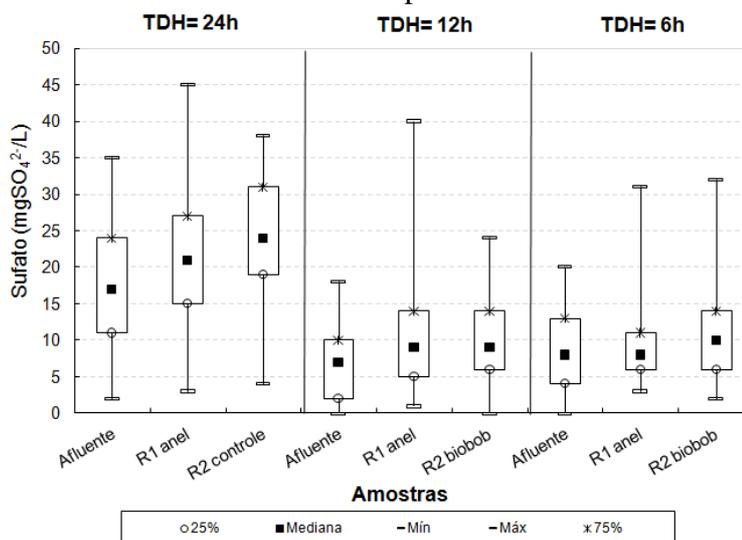
Figura 6.4 - Perfil das concentrações de tiosulfato no afluente e efluente dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais.



De acordo com figura 6.4, pode-se observar que os valores medianos dos reatores nas fases 1 e 2 mostraram uma ligeira remoção de tiosulfato, assim como no R2-6h na fase 3. A análise estatística com o teste Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$) não demonstrou diferença significativa entre os reatores e dos mesmos em relação ao afluente.

No que se refere ao monitoramento de sulfato no afluente e efluente dos reatores, a figura 6.5 mostra os resultados obtidos.

Figura 6.5 - Perfil das concentrações de sulfato no afluente e efluente dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais.



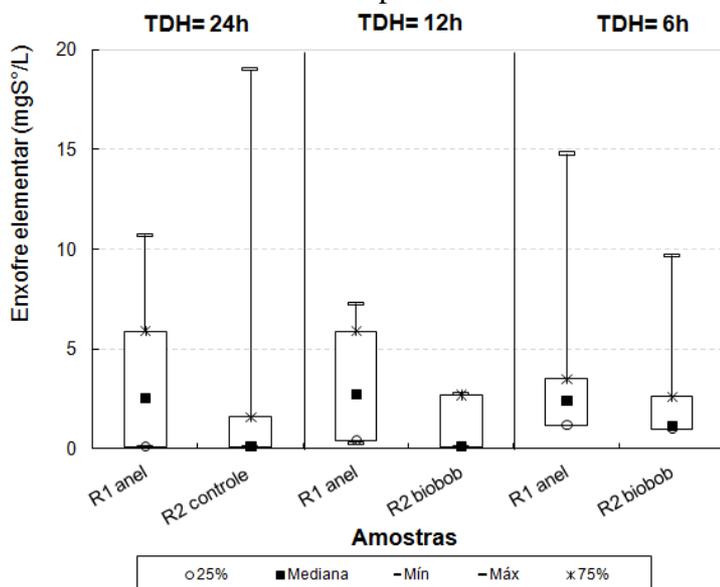
A análise estatística com o teste Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$) não mostrou diferença estatística significativa entre os reatores e dos mesmos com o afluente. Portanto, não houve consumo e produção de sulfato nos reatores indicando que não deve ter ocorrido oxidação biológica completa de sulfeto a sulfato nos reatores.

Portanto, no presente estudo os resultados obtidos quanto ao produto final da oxidação de sulfeto nos reatores foram diferentes daqueles obtidos por Janssen *et al.* (1995), que operaram reatores em bateladas contendo biomassa em suspensão de *Thiobacillus* sp, sob condições limitantes de oxigênio dissolvido (0,5-1,0 mg/L). Os resultados mostraram que apesar do enxofre elementar e tiosulfato terem sido produzidos, no decorrer da operação, o sulfato foi o principal produto da oxidação do sulfeto.

Os resultados obtidos por Janssen *et al.* (1995) difere dos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que o sulfato não foi o produto final da oxidação de sulfeto, portanto o sulfeto deve ter sido oxidado biologicamente a enxofre elementar.

Os resultados apresentados na Figura 6.6 correspondem à determinação da concentração de enxofre elementar presente no efluente de ambos os reatores, nas três fases operacionais. Os resultados do monitoramento do afluente demonstraram ausência de enxofre elementar.

Figura 6.6 - Box-plot das concentrações de enxofre no afluente e efluente dos reatores 1 e 2, nas três fases operacionais.



Conforme figura 6.6 é possível verificar que o R1, nas três fases operacionais propiciou maior produção de enxofre elementar quando comparado com o R2. Nas três fases

operacionais, os anéis plásticos do R1 propiciaram maior produção de enxofre quando comparado com a espuma do R2(controle) na fase 1 e o biobob do R2 na fase 2 e 3.

A análise estatística com o teste Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$) mostrou diferença estatística entre os reatores 1 e 2 nas três fases operacionais, indicando que uma grande quantidade de enxofre foi desprendido dos reatores e foi liberado no efluente. Nesse sentido, é possível que o enxofre elementar medido no efluente dos reatores seja principalmente oriundo da lise celular, uma vez que o S^0 produzido pelas sulfobactérias pode ser acumulado em grânulos intracelulares.

A oxidação parcial do H_2S a S^0 pode ser realizada pelas sulfobactérias, no qual o S^0 produzido pode ser depositado fora da célula ou acumulado em grânulos intracelulares. Janssen *et al.* (2009) relataram que os glóbulos de enxofre, depositados dentro ou fora das células de sulfobactérias, apresentam diâmetro maior que 1 micrômetro, podem apresentar forma esférica ou elipsoidal e se dissolvem em vários solventes orgânicos, tais como: acetona, etanol e clorofórmio. Além disso, o enxofre biologicamente produzido é hidrofílico e apresenta coloração branca ou amarelo-palha.

6.1.3 Balanço de distribuição de enxofre elementar no lodo, biofilme e efluente dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.

Segundo Kadlec e Wallace (2009), o enxofre elementar produzido por sulfobactérias pode ser depositado nas matrizes de meios filtrantes sob condições de contínua aplicação de sulfeto e disponibilidade de carbono orgânico. Uma vez que os reatores foram operados em condições similares, ou seja, a aplicação de sulfeto foi contínua e o carbono orgânico estava disponível, em função da própria característica do afluente (efluente do reator UASB que continha DQO remanescente oriunda do esgoto doméstico), realizou-se a quantificação do enxofre elementar no biofilme e lodo dos reatores.

Conforme apresentado no tópico anterior, foi determinada a concentração de enxofre elementar (mg/L) no afluente e efluente dos reatores. No tópico a seguir serão apresentados os valores da massa de enxofre elementar acumulado bem como a concentração de STV no biofilme e lodo dos reatores. A tabela 6.2 apresenta a concentração de sólidos totais voláteis (STV) e de enxofre elementar presente na biomassa, acumulada durante três meses nos reatores e as equações utilizadas para o desenvolvimento da tabela 6.2 estão no apêndice A.

Os resultados da tabela serão discutidos considerando a influência do TDH, da presença e do tipo de material suporte nos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.

Tabela 6.2 - Massa de STV e enxofre elementar das amostras de lodo e biofilme acumulado durante três meses de operação dos reatores.

Reator (TDH)	Lodo			Biofilme			Massa de S° total produzida (lodo e biofilme) (mg)
	Massa de STV (g)*	Massa S° (mg)*	Relação específica (mgS°/gSTV)	Massa de STV (g)*	Massa S° (mg)*	Relação específica (mgS°/gSTV)	
R1-24h	19,2±4,6	512± 3,7	26,6	204±1,3	3024 ± 0,9	14,8	3536,0
R2-24h**	10,3±2,0	29,5±3,6	2,9	3,2±1,1	7,7 ±4,2	2,4	37,2
R1-12h	8,0±3,0	153±29,1	19,1	1038±1,9	553 ± 2,6	0,5	706,0
R2-12h	6,6±4,5	157±55,3	23,8	410±0,6	147,6±17,4	0,4	304,6
R1-6h	31,4±4,1	566±34,0	18	38,6±6,0	2564,5± 0,8	66,4	3130,5
R2-6h	35±6,9	567±28,6	16,2	16,2±3,9	459± 0,9	28,3	1026,0

*valores médios referente as três medições realizadas mensalmente.

** no R2-24h a massa de STV e S° do biofilme, refere-se a espuma, pois nessa fase o reator não tinha meio suporte.

Análise comparativa entre os reatores quanto a influência do TDH no acúmulo de STV e enxofre elementar nas amostras de espuma, biofilme e lodo.

A partir da tabela 6.2, comparando os valores encontrados para R1 (contendo anéis plásticos), verifica-se que maior massa de S° foi acumulada no biofilme de R1 com TDH de 24h, porém maior relação específica foi encontrada no biofilme do R1 com TDH de 6h, indicando que a redução do TDH favoreceu o maior acúmulo de S por g de biomassa (STV) no biofilme.

Por outro lado, quando esta análise é feita para o R2 (comparando R2-12h com R2-6 h), verifica-se que maior quantidade de massa de S° total foi produzida no R2-6h, indicando que a redução do TDH favoreceu maior acúmulo de S°. Provavelmente isso ocorreu, pois com a redução do TDH, maior carga de sulfeto foi aplicada ao reator. No TDH de 12h, a carga de sulfeto aplicada nos reatores foi de 0,004g/L.d, enquanto que no TDH de 6h, a carga aplicada foi de 0,012g/L.d.

Além disso, foi possível observar no R2 que a diminuição do TDH de 24h para 12h e 6h, respectivamente, propiciou maior massa de S° total produzida nos reatores. A diminuição do TDH de 24h para 12h propiciou maior massa de STV no biofilme do R2-12h, quando

comparado com a massa de STV na espuma, possivelmente devido a presença do meio suporte no R2-12h, enquanto que maior massa de STV foi observada no lodo do R2-24h, provavelmente devido ao desprendimento da espuma para o lodo do reator,

Análise comparativa entre os reatores quanto a influência da presença de material suporte no acúmulo de STV e enxofre elementar nas amostras de espuma, biofilme e lodo.

Com relação a influência da presença de meio suporte, ao comparar o R1-24h contendo anéis plásticos com o R2-24h, sem meio suporte, os resultados indicaram que o R1 contendo material suporte apresentou maior retenção de biomassa e maior acúmulo de enxofre elementar no biofilme e no lodo, quando comparado com o R2, sem material suporte. No R1 também foi possível observar maior massa de S° total produzida (cerca de 100 vezes mais) quando comparado com o R2.

No que se refere os valores de relação específica ($mgS^{\circ}/gSTV$) do R1-24h e R2-24h, verifica-se que o valor apresentado para o R1-24h foi maior se comparado com o valor determinado para o R2-24h, indicando que a presença do material suporte favoreceu maior acúmulo de S° por g de STV no biofilme e no lodo do R1. Portanto, a presença do material suporte foi fundamental para favorecer a oxidação biológica de sulfeto e maior acúmulo de S elementar.

Análise comparativa entre os reatores quanto a influência do tipo de material suporte no acúmulo de STV e enxofre elementar nas amostras de lodo e biofilme.

Conforme mostra a tabela 6.2, na fase 2 (TDH =12h) os resultados indicaram que o R1, contendo anéis plásticos como material suporte, apresentaram maior retenção de biomassa no biofilme e lodo, quando comparado com o R2, contendo biobob. Ainda na fase operacional 2, o R1 contendo anéis plásticos apresentou maior acúmulo de enxofre elementar e maior valor de relação específica ($mgS^{\circ}/gSTV$) no biofilme quando comparado com o R2. Além disso, a massa de S° total produzida foi maior no R1-12h quando comparado com o R2-12h.

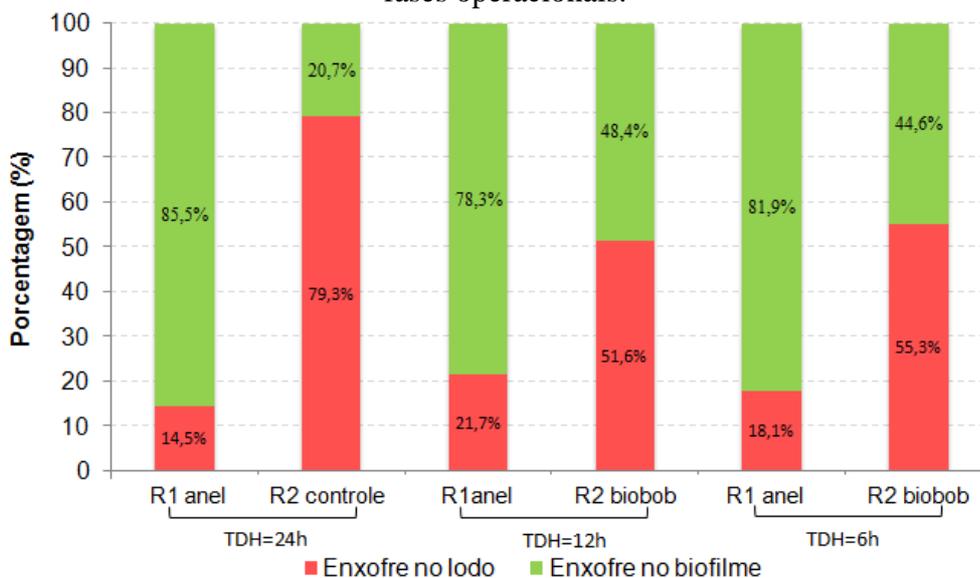
Enquanto que na fase 3 (TDH=6h), os resultados mostram que o R1, contendo anéis plásticos apresentaram maior retenção de biomassa e acúmulo de S° no biofilme quando comparado com o R2, contendo biobob. Nesta fase operacional o R1 também apresentou maior valor de relação específica ($mgS^{\circ}/gSTV$) no biofilme do que o R2. Além disso, no R1 também foi possível observar maior massa de S° total produzida quando comparado com o R2.

Com relação a presença de enxofre no lodo, os reatores R2-12h e R2-6h apresentaram maior acúmulo de enxofre no lodo, porém o R2-12h apresentou maior valor da relação específica (mgS^0/gSTV) quando comparado com o R2-6h. Portanto, com relação a massa de enxofre no lodo, o biobob no R2, nos TDH de 12h e 6h favoreceu maior acúmulo de lodo quando comparado com o R1 contendo anéis plásticos. Possivelmente, o acúmulo de enxofre no lodo, ocorreu devido ao desprendimento do biofilme contendo grânulos de S^0 para o fundo do reator e conseqüentemente, o enxofre presente nessas células que sedimentaram foi determinado na fração do lodo.

Todavia, uma vez que o R1 apresentou maior massa de enxofre total produzida nas fases operacionais 2 e 3, foi possível observar a influência do material suporte já que o anel plástico foi mais favorável ao acúmulo de biomassa e de enxofre elementar quando comparado com material suporte biobob. O enxofre acumulado no biofilme dos reatores indica a presença de sulfobactérias capazes de realizar a oxidação parcial de sulfeto a enxofre elementar.

A figura 6.7 mostra a distribuição de S^0 com base na produção de enxofre total nos reatores, nos TDH de 24h, 12h e 6h, respectivamente. O valor de enxofre elementar no efluente dos reatores foi muito baixo, representando somente 0,01% a 0,04% de enxofre; uma parcela mínima quando comparada com a distribuição de enxofre no biofilme e lodo dos reatores, e portanto não foram consideradas no gráfico.

Figura 6.7 - Distribuição do enxofre no lodo e no biofilme dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.



Análise comparativa entre os reatores quanto a influência do TDH na distribuição de enxofre no lodo e no biofilme dos reatores.

Conforme a figura 6.7, é possível verificar que a redução do TDH para 12h e 6h apresentou pouca influência no R1, quanto ao acúmulo de enxofre elementar no biofilme e no lodo, já que o acúmulo de enxofre no R1 foi similar nas duas fases operacionais.

Com relação ao reator R2 (comparando-se R2-12h e R2-6h) é possível observar o mesmo comportamento quanto ao acúmulo de enxofre, ou seja, houve pouca influência do TDH no acúmulo de enxofre no biofilme e no lodo do R2, nas duas fases operacionais. Além disso, ao verificar a porcentagem de enxofre acumulado no R2-12h e R2-6h, observa-se que tanto no biofilme quanto no lodo, o acúmulo de enxofre foi semelhante com valores próximos de 50%.

Análise comparativa entre os reatores quanto a influência da presença de material suporte na distribuição de enxofre no lodo e no biofilme dos reatores.

Os resultados da figura 6.7 corroboram com aqueles obtidos na tabela 6.2, ou seja, a presença de material suporte no R1-24h (anéis plásticos) influenciou no maior acúmulo de enxofre elementar no biofilme, que se desenvolveu nos anéis plásticos, quando comparado com o R2-24h, sem meio suporte. Uma consideração importante é que durante a coleta dos anéis plásticos, foi possível observar que houve crescimento de biofilme nos interstícios dos anéis plásticos, portanto, o enxofre elementar proveniente da oxidação de sulfeto pode ter acumulado em grânulos intracelulares, nas sulfobactérias que constituíam o biofilme.

Por outro lado, o R2-24h apresentou maior acúmulo de enxofre no lodo do que o R1-24h. Considerando que a espuma no R2-24h se dispôs como uma camada, na superfície no reator, pode ter ocorrido a fragmentação dessa camada propiciando o desprendimento da biomassa e a sedimentação do enxofre para o lodo no fundo do reator. Segundo Souza *et al.* (2006), a espuma dispõe-se como camada sólida composta por materiais remanescentes ao tratamento e pode formar uma trama constituída por esses materiais e por micro-organismos filamentosos.

Análise comparativa entre os reatores quanto a influência do tipo de material suporte no acúmulo de STV e enxofre elementar nas amostras de lodo e biofilme.

Com base na comparação entre o R1 e o R2, nos TDHs de 12h e 6h, é possível verificar que a presença do biobob como material suporte no R2 influenciou no maior acúmulo de enxofre no

lodo, quando comparado ao R1, contendo anéis plásticos. Apesar do biobob apresentar maior área superficial que os anéis plásticos, foi possível observar a formação de um biofilme ao redor do biobob, que pode ter facilmente se desprendido e levado os grânulos de enxofre para o lodo do reator.

Por questões ecológicas e ambientais, a formação de enxofre elementar é preferencial na oxidação biológica de sulfeto porque é insolúvel e assim, pode ser removido de meios líquidos, reduzindo-se o conteúdo total do composto enxofre de águas residuárias (ELSHAHED *et al.*, 2003). A recuperação do enxofre elementar é muito valiosa pelo fato do enxofre poder ser novamente empregado em processos industriais como produção de ácido sulfúrico, ou na agricultura, na composição de fertilizantes (VANNINI *et al.*, 2008).

Segundo o Departamento Nacional de Produção Mineral, em 2006, o Brasil importou cerca de 3,1 milhões de toneladas de enxofre, representando o maior volume de enxofre importado nos sete anos anteriores, sendo 95,33 % de enxofre a granel e 4,66 % ácido sulfúrico. Os gastos com importação de enxofre foram cerca de US\$ 103,50 milhões, quase o dobro do volume importado em 2005 de enxofre a granel (US\$ 108,3 milhões / 1,6 milhões de toneladas). Assim, o Brasil pagou cerca de R\$33,00 por cada 1g de enxofre importado em 2006.

Com o intuito de avaliar a viabilidade econômica de recuperação do enxofre elementar dos reatores desse trabalho, calculou-se o rendimento econômico que o R1-24h forneceria, caso o enxofre elementar fosse recuperado do lodo e do biofilme desse reator, já que o R1-24h apresentou o maior valor de massa de S^o total produzida no reator. Considerando que durante o período de três meses foi acumulado 3,5g de enxofre no R1-24h, estimou-se que mensalmente 1,2g de enxofre foi acumulado no reator. Uma vez que a importação de enxofre no Brasil em 2006 gerou o gasto de cerca de R\$33,00 para cada 1g de enxofre, esse custo seria reduzido, caso 1g de enxofre fosse recuperado do R1-24h. Portanto, se o reator desse estudo fosse implantado em escala real com intuito de recuperação de enxofre, o mesmo contribuiria para redução dos custos de importação de enxofre no Brasil.

A fim de estimar a recuperação de enxofre a partir do esgoto doméstico tratado anaerobiamente em uma estação de tratamento de esgotos, tal como a ETE Onça, serão apresentados os cálculos a seguir.

A ETE Onça trata 1800L/s de esgoto. Se utilizarmos o R1-24h como referência, teríamos que em 1 mês o reator acumulou aproximadamente 1g de S^o proveniente de 900L de esgoto tratado, assim teríamos 2g de S^o recuperado a partir de 1800L. Portanto, a partir da vazão tratada na ETE onça por dia, teríamos recuperado 172.800 gramas de S^o e isso corresponderia a uma economia de R\$ 5.702.400,00 (cerca de cinco milhões e setecentos mil reais).

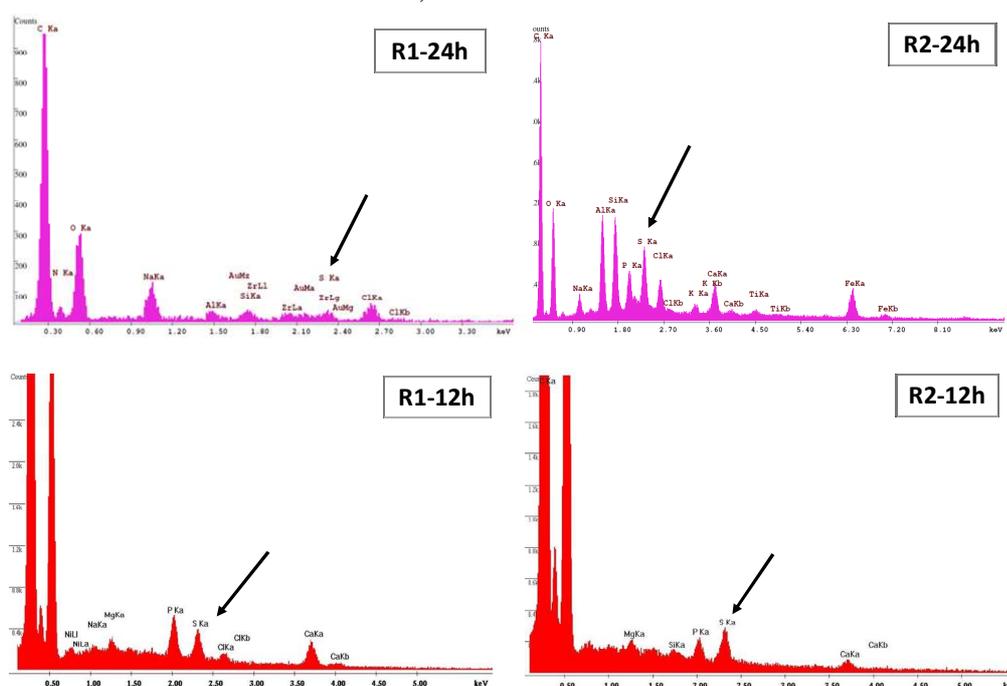
6.2 Análises microbiológicas das amostras dos reatores nas diferentes fases operacionais

6.2.1 Análise de microscopia eletrônica de varredura com EDX das amostras dos reatores

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura associada a análise de EDX, foram coletadas as seguintes amostras: biofilme do reator 1 (TDH de 24h e 12h), biofilme do reator 2 (TDH de 12 h) e espuma do reator 2 (sem meio suporte). Os resultados das análises de EDX confirmaram a presença de enxofre em todas as amostras analisadas, conforme mostra a figura 6.8.

Os picos que correspondem ao enxofre estão indicados pelas setas, mostrando a presença de enxofre nas amostras. Os resultados de EDX confirmam que o sulfeto de hidrogênio presente no efluente anaeróbico foi biologicamente oxidado a enxofre dentro dos reatores.

Figura 6.8 - Espectrogramas do EDX e elementos químicos presentes nas amostras dos biofilmes dos reatores R1 e R2, nos TDHs de 24 e 12h e espuma do R2-24h.



Resultados similares foram encontrados por Silva *et al.* (2002) que observaram enxofre em reator operado sob condições anaeróbias para remoção de sulfato de águas residuárias. A análise por meio de EDX revelou que o precipitado formado sobre o material suporte utilizado para imobilização de bactérias redutoras de sulfato continha a presença de enxofre e outros elementos tal como o sódio.

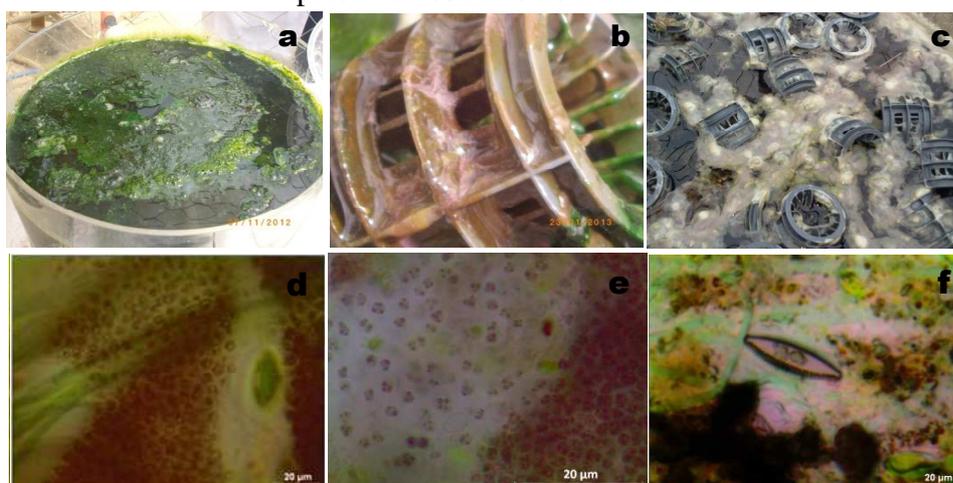
Silva (2005) em sistema composto de reator anaeróbio horizontal de leito fixo associado a um reator de oxidação de sulfeto, tratando água residuária sintética, realizou análise de EDX na amostra de material granular do fundo do reator e demonstrou que o precipitado era enxofre.

6.2.2 Análise por microscópica óptica dos micro-organismos presentes nos reatores

As observações microscópicas foram feitas com as amostras do biofilme dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais dentre as quais as amostras da fase operacional 1 (TDH=24h) estão apresentadas na figura 6.9, juntamente com a análise microscópica do lodo e da espuma que foi feita somente no TDH de 24h.

A figura 6.9 mostra os resultados da análise de microscopia óptica das amostras de biomassa dos reatores, seja aderida no meio suporte no R1-24h ou dispersa no R2-24h, bem como a coloração verde e rosa da comunidade microbiana que desenvolveu nos reatores (Figura 6.9 a e b).

Figura 6.9 - (a-c) Imagens da biomassa microbiana que desenvolveu durante a oxidação biológica de sulfeto nos reatores R1 e R2. (d-f) Observações microscópicas da biomassa presente nos reatores R1 e R2.



Legenda: (a) espuma formada no R2-24h (controle), (b) biofilme do R1-24h, (c) aparência da superfície do reator R1-24h, com detalhe do material suporte com pontos brancos que correspondem ao enxofre, (d) biofilme do R1-24h, (e) e (f) espuma e lodo do R2-24h, respectivamente.

Após 147 dias de operação foi possível visualizar partículas de enxofre esbranquiçadas na superfície do R1-24h indicando a presença de enxofre elementar (Figura 6.9 c), sendo mais um indicativo de oxidação biológica de sulfeto a S⁰ que corroboram com os resultados físico-químicos apresentados anteriormente. Segundo Buisman *et al.* (1989) e Janssen *et al.* (1995) a presença de glóbulos de coloração verde amarelada está relacionada com a formação de polissulfetos e a presença de glóbulos esbranquiçados com a formação de enxofre elementar.

Uma vez que a presença de enxofre elementar foi detectada, as observações microscópicas foram realizadas a fim de verificar a presença de bactérias oxidadoras de sulfeto. Os resultados mostraram a presença de bactérias púrpuras com morfologia de cocos (figura 6.9), similar a sulfobactéria do gênero *Chromatium* sp., da família *Chromatiaceae*. Essas bactérias foram observadas com frequência nas amostras dos reatores, nas três fases operacionais. Esta bactéria é gram-negativa e pode apresentar morfologia de cocos ou bastonete e já foi encontrada em sistemas de tratamento de águas residuárias (SIEFERT *et al.*, 1978).

O gênero *Chromatium* corresponde à bactérias fototróficas púrpuras, que podem utilizar sulfeto como doador de elétrons para redução de CO₂ na fotossíntese. Uma vez que sulfeto é oxidado a enxofre elementar, o mesmo é estocado em grânulos intracelulares (MADIGAN *et al.*, 2010). Portanto, as observações microscópicas de bactérias com potencial de oxidação de sulfeto, juntamente com os resultados mencionados anteriormente quanto ao consumo de sulfeto nos reatores indicam que o sulfeto dissolvido presente no efluente anaeróbico foi biologicamente oxidado e convertido a enxofre elementar.

Com relação à presença de outros micro-organismos nos reatores, cianobactérias e algas foram observadas por microscopia em todas as amostras dos reatores, juntamente com a sulfobactéria similar ao gênero *Chromatium* sp. Uma vez que os reatores foram construídos com material transparente, provavelmente a incidência de luz favoreceu a presença de algas e cianobactérias, bem como o desenvolvimento de sulfobactérias púrpuras, que necessitam de luz para realização da fotossíntese anoxigênica.

Segundo Stal (1995), cianobactérias e bactérias fototróficas sulfurosas podem coexistir em ambientes com gradiente de concentração de oxigênio e sulfeto, tais como os biofilmes. Esta coexistência é atribuída ao grau de tolerância ao oxigênio. Contudo, diferente das cianobactérias, as bactérias fototróficas púrpuras ocupam as regiões mais profundas do biofilme devido ao efeito inibidor do oxigênio na síntese dos pigmentos.

Comparando as observações de Stal (1995) e as realizadas em campo, foi possível visualizar uma camada verde superficial que cobria todos os anéis plásticos, além disso, quando esta camada era removida foi possível visualizar uma coloração púrpura aderida aos anéis, conforme apresentado na figura 6.9b.

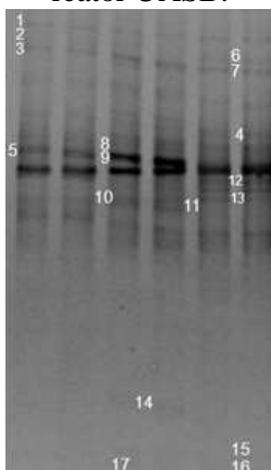
Esperava-se observar na espuma do R2-24h morfologia similar à *Beggiatoa* e *Thiotrix* que são gêneros de sulfobactérias incolores, já que no estudo realizado por Garcia *et al.* (2012), esses micro-organismos foram observadas na espuma do reator UASB, que foi o mesmo reator utilizado neste estudo para alimentar os reatores R1 e R2.

A razão para a ausência das sulfobactérias incolores no R1 e R2 poderia estar relacionada a ocorrência de competição pelo sulfeto, entre estas sulfobactérias incolores e as púrpuras (*Chromatium* sp). As sulfobactérias púrpuras são capazes de se moverem para camadas mais inferiores (em direção ao sedimento, com baixa intensidade de luz) e utilizarem o enxofre acumulado no sedimento para a oxidação de sulfeto (JORGENSEN e DES MARAIS, 1986).

6.2.1 Caracterização da comunidade bacteriana pela análise de PCR-DGGE da espuma do decantador do reator UASB.

A análise de PCR-DGGE foi feita com a amostra de espuma coletada do decantador do reator do UASB no início da operação dos reatores, em outubro/2012. A fim de verificar a composição da comunidade bacteriana desenvolvida na espuma do reator UASB e comparar com os resultados obtidos da comunidade bacteriana presente nos reatores R1 e R2, foi realizado a análise de DGGE (Figura 6.10).

Figura 6.10 - Perfil de DGGE da comunidade bacteriana presente na amostra de espuma do reator UASB.



As bandas numeradas no gel foram excisadas e o DNA foi sequenciado para identificação dos micro-organismos na espuma do reator UASB (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Posição taxonômica das bandas de DDGE obtidas da amostra de espuma do reator UASB de acordo com RDP Classifier em um nível de confiança de 80% e as sequências mais próximas obtidas no GenBank relacionadas ao gene 16S rRNA, e a porcentagem de similaridade é apresentada por meio da ferramenta BLAST.

Banda	Filo	Classe/Família	Gene RNAr16S	Função	Similaridade*
1,3, 6, 7	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobea/Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobium ferrooxidans</i>	Oxidação de sulfeto	96
2	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobea/Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobium ferrooxidans</i>	Oxidação de sulfeto	99
4	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria/Rhodospirillaceae</i>	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	Desnitrificação, quimioheterotrófica, podem fixar N ₂ .	93
5,9	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria/Ectothiorhodospiraceae</i>	<i>Nitrococcus mobilis</i>	Oxidação de nitrito	92
8	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria/Chromatiaceae</i>	<i>Thiorhodovibrio sp.</i>	Oxidação de sulfeto	90
10	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Parabacteroides johnsonii</i>	Fermentação; isolado de fezes humanas	93
11,13	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Methylacidiphilaceae</i>	<i>Methylacidiphilum fumariolicum</i>	Oxidação de metano	91
12	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria/Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax delafieldii</i>	Redução de nitrato e nitrito	98
14	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Anaerophaga thermohalophila</i>	Fermentação de acetato, propionato e succinato	95
15	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Alistipes sp.</i>	Fermentação; presente no trato intestinal humano	92
16,17	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobea/Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobium sp.</i>	Oxidação de sulfeto	96
18	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria/Hydrogenophilaceae</i>	<i>Thiobacillus sp.</i>	Oxidação de sulfeto	95
19	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria/Methylophilaceae</i>	Uncultured <i>Methylobacillus sp.</i>	Oxidação de metano	95

*A porcentagem indica a similaridade entre a sequência da banda com a sequência disponível no GenBank que mostrou maior correspondência.

Conforme tabela 6.3, a comunidade bacteriana presente na espuma do reator UASB apresentou-se diversificada, com presença de sequências similares a diferentes gêneros envolvidos na oxidação de sulfeto, redução de nitrato, oxidação de metano, bem como desnitrificantes. Assim, a presença desses microrganismos na espuma, sugere a possibilidade de ocorrência de remoção de compostos tais como nitrito, nitrato, metano e sulfeto.

Do total de bandas sequenciadas, cinco bandas com sequências próximas ao gênero *Chlorobium ferroxidans*, uma bactéria fototrófica verde, em forma de bastonete, gram negativa e estritamente anaeróbia. Esta bactéria fototrófica só foi isolada de uma co-cultura com proteobactéria *Geospirillum arsenophilu*. Quando cultivadas em co-cultura, *Chlorobium ferroxidans* oxida ferro ferroso à ferro férrico (HEISING *et al.*, 1999) Além disso, os resultados da comunidade bacteriana da espuma do reator UASB, apresentaram uma sequência próxima a *Acidovorax delafieldii* e sequências relacionadas a *Anaerophaga thermohalophila* e *Methylobacillus*.

Os resultados obtidos indicam uma sequência relacionada a *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Alistipes sp.*, *Parabacteroides johnsonii* e duas sequências relacionadas a *Nitrococcus mobilis* e *Methylacidiphilum fumariolicum*, uma metanotrófica capaz de fixar N₂ em baixas concentrações de oxigênio dissolvido (KHADEM *et al.*, 2010).

Com relação as bactérias oxidadoras de sulfeto presentes na espuma do reator UASB, os resultados indicaram que do total de 19 bandas sequenciadas, duas sequências foram relacionadas com *Chlorobium sp.*, representante de sulfobactéria verde, uma sequência foi relacionada com *Thiorhodovibrio sp.* representante de sulfobactéria púrpura e uma sequência relacionada com *Thiobacillus sp.*, representante de sulfobactéria incolor. Estes resultados sugerem que esses microrganismos presentes na espuma do reator UASB possuem potencial para remover de compostos reduzidos de enxofre do efluente do reator.

Especificamente a sulfobactéria verde *Chlorobium sp.* destaca-se por realizar fotossíntese anoxigênica utilizando o sulfeto como doador de elétrons. Além disso, a cultura pura de bactéria *Chlorobium sp* foi utilizada em um biorreator com incidência direta de luz, não aerado e tratando efluente orgânico industrial. A eficiência de remoção de sulfeto foi de 99,5%, com aplicação no biorreator de 0,0016 kgS²/m³.d de sulfeto (FERRERA *et al.*, 2004).

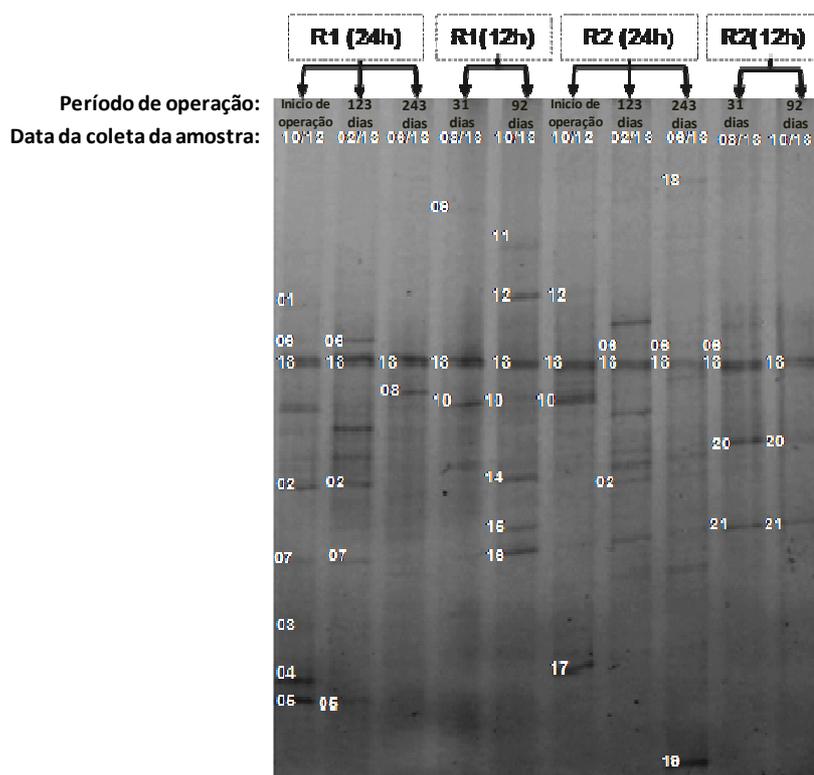
Em relação a *Thiorhodovibrio sp.* esta sulfobactéria púrpura é uma representante da família *Chromatiaceae*, encontrada principalmente em sedimentos de lagos contendo sulfeto de hidrogênio, apresentam morfologia de vibrião e quando realizam a oxidação de sulfeto, o enxofre elementar formado é acumulado em grânulos intracelulares (OVERMANN *et al.*, 1992). Com relação ao *Thiobacillus sp.*, as bactérias desse gênero foram amplamente utilizadas em estudos de conversão do H₂S e outros compostos sulfurosos por processos biológicos (PLAS *et al.*, 1993).

As espécies do gênero *Thiobacillus* produzem o enxofre extracelular e utilizam compostos inorgânicos como fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono (FRIEDRICH, 1998). Janssen *et al.* (1999) reportaram que as bactérias do gênero *Thiobacillus* podem competir com sucesso com processos químicos devido a sua alta afinidade por sulfetos. No entanto, como a formação do sulfato produz mais energia, essa rota é preferencialmente realizada pelos microrganismos. Assim, a formação de enxofre elementar somente ocorrerá sob concentrações limitadas de oxigênio ou alta concentração de sulfeto.

6.2.2 Caracterização da comunidade bacteriana pela análise de PCR-DGGE do R1 e R2.

A fim de verificar a composição da comunidade bacteriana desenvolvida nos reatores R1 e R2, nas diferentes fases operacionais 1 e 2 foi realizado a análise de DGGE (Figura 6.11).

Figura 6.11 - Perfil de DGGE da comunidade bacteriana presente nas amostras dos reatores R1 e R2, no TDH de 24h e 12h.



As bandas numeradas no gel foram excisadas e o DNA foi sequenciado para identificação dos micro-organismos em cada amostra dos reatores 1 e 2, nas condições testadas, tais como presença e ausência de meio suporte (TDH=24h) e comparação entre o tipo de material suporte, anel plástico e biobob (TDH=12h) (Tabela 6.4).

Tabela 6.4 - Posição taxonômica das bandas de DDGE obtidas das amostras dos R1 e R2, no TDH de 24h e 12h, de acordo com RDP Classifier em um nível de confiança de 80% e as sequências mais próximas obtidas no GenBank relacionadas ao gene 16S rRNA, e a porcentagem de similaridade é apresentada por meio da ferramenta BLAST.

Banda	Filo	Classe/Família	Acc. No.	Gene RNAr16S	Similaridade*
01	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli, Clostridia and Erysipelotrichia</i>	AB896675	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	99%
02	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	KF206381	<i>Tepidimonas</i> sp	100%
03	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria/Xanthomonadaceae</i>	JQ349048	<i>Lysobacter</i> sp	97%
04	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria/Xanthomonadaceae</i>	KF911330	<i>Lysobacter brunescens</i>	97%
05	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria/Rhodospirillaceae</i>	NR_025830	<i>Rhodocista pekingensis</i>	98%
06	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	EF123634	Uncultured <i>Cianobacterium</i>	92%
07	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria/Xanthomonadaceae</i>	FJ821616	<i>Thermomonas</i> sp	100%
08	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria/Methylococcaceae</i>	KJ081955	<i>Methylomonas</i> sp	98%
09	<i>Chlorobi</i>	<i>Chlorobia/Chlorobiaceae</i>	DQ383316	Uncultured <i>Chlorobium</i> sp	90%
10	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria/Chromatiaceae</i>	HQ003533	Uncultured <i>Chromatiaceae</i> bacterium	97%
11	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia/Incertae Sedis</i>	NR_025761	<i>Soehngenia saccharolytica</i>	97%
12	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli, Clostridia e Erysipelotrichia</i>	AB896675	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	99%
13	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria/Neisseriaceae</i>	KC492099	<i>Gulbenkiania mobilis</i>	87%
14	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria/Bradyrhizobiaceae</i>	FJ210722	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	93%
15	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria/Xanthomonadaceae</i>	FJ821616	<i>Thermomonas</i> sp	97%
16	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	GU179797	Uncultured <i>Bacterioides</i> bacterium	93%
17	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria/Rhodospirillaceae</i>	NR_025830	<i>Rhodospirillum centenum</i>	99%
18	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	EF123634	Uncultured <i>Cianobacterium</i>	92%
19	<i>Chloroflexi</i>	<i>Oscillochloridaceae</i>	JX298781	<i>Chloronema giganteum</i>	91%
20	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria/Bradyrhizobiaceae</i>	FJ210722	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	99%
21	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria/Xanthomonadaceae</i>	KF7170461	<i>Thermomonas</i> sp	99%

*A porcentagem indica a similaridade entre a sequência da banda com a sequência disponível no GenBank que mostrou maior correspondência.

Os resultados obtidos com o DGGE demonstraram que a comunidade bacteriana presente nos reatores 1 e 2, nas duas fases operacionais, foi diversificada. A banda 13, que apareceu em todas as amostras dos dois reatores e permaneceu presente nas duas diferentes fases operacionais, apresentou sequência relacionada a *Gulbenkiania mobilis*. Essa bactéria é gram-negativa, aeróbia, quimioheterotrófica e foi isolada do tratamento de águas residuárias. O crescimento desse micro-organismo ocorre na presença de nitrato (MOREIRA *et al.*, 1997).

As bandas 14 e 20 foram presentes nos R1-12h e R2-12h, respectivamente e apresentaram sequências próximas a *Rhodopseudomonas palustris* e a banda 17, presente somente no R2-24h (controle), apresentou sequência próxima a *Rhodospirillum centenum*. Ambas as bactérias são fototróficas púrpuras não sulfurosas e não há relatos na literatura sobre a capacidade dessas bactérias realizarem a oxidação de sulfeto a sulfato. (FRIGAARD & DAHI, 2009).

Rhodopseudomonas palustris pode apresentar crescimento fotoautotrófico, fotoheterotrófico, quimioautotrófico e quimioheterotrófico. A versatilidade metabólica dessa bactéria permite seu crescimento em condições anaeróbias e obtém energia de diferentes compostos orgânicos. Além disso, essa bactéria tem a habilidade de degradar compostos orgânicos em condições aeróbias e anaeróbias (PANT *et al.*, 2010).

Os resultados de DGGE mostraram a presença de sequências de sulfobactérias púrpuras e verdes, em ambos os reatores. A banda 10, presente no R1-12h e R2-24h, apresentou sequência próxima a bactéria não cultivada de *Chromatiaceae*, enquanto que a banda 9 (presente somente no R1-12h) e 19 (presente somente no R2-24h) apresentou sequência relacionada com *Chlorobium* sp e *Chloronema giganteum*, respectivamente.

Com relação a sulfobactéria púrpura presente nos reatores, *Chromatium* é uma bactéria gram-negativa, que pode realizar a oxidação de sulfeto e acumular grânulos de enxofre intracelular (MADIGAN *et al.*, 2010). Enquanto que *Chloronema giganteum* é uma sulfobactéria fototrófica verde filamentosa, que é comumente encontrada em lagos, tapetes microbianos e em fontes geotérmicas, contendo baixas concentrações de sulfeto (ABELLA *et al.*, 1992).

As sulfobactérias verdes do gênero *Chlorobium* sp também são fototróficas e são comumente encontradas em ambientes aquáticos anóxicos, sedimentos e outros ambientes ricos em

sulfeto, incluindo nascentes de águas quentes (VAN DEN ENDE e VAN GEMERDEN, 1993).

A banda 2, presente no R1-24h e R2-24h, corresponde ao gênero *Tepidimonas* sp., bactérias desse gênero são quimilitheterotróficas, ligeiramente termofílicas e aeróbias estritas, capazes de oxidarem tiosulfato e tetrionato a sulfato (MOREIRA, 1997).

Portanto, estes resultados indicam que essas bactérias podem estar envolvidas na oxidação de compostos reduzidos de enxofre do efluente do reator UASB, uma vez que enxofre elementar e sulfato foram formados e detectados nos reatores 1 e 2.

A banda 5, presente no R1-24h e a banda 17 presente no R2-24h, apresentaram sequências próximas à sequência da bactéria púrpura não sulfurosa *Rhodospirillum centenum* e *Rhodocista pekingensis*, respectivamente. *Rhodocista pekingensis* foi isolada do tratamento de águas residuárias, é bactéria gram-negativa, que pode apresentar crescimento fototrófico anaeróbio ou quimioheterotrófico aeróbio e é capaz de utilizar H₂ como doador de elétrons (ZHANG *et al.*, 2003). Na literatura não há relatos do envolvimento dessas bactérias púrpuras não sulfuradas na oxidação de sulfeto ou tiosulfato. Porém, há relatos de que essas bactérias estariam envolvidas na degradação de ácidos graxos voláteis de cadeia curta presentes em águas residuárias (OKUBO *et al.*, 2006).

Bactérias fototróficas tais como *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum tenue*, *Chromatium limicola*, *Thiocapsa roseopersicina*, *Chlorobium limicola* foram encontrados no sistema de lodos ativados e segundo os autores, a presença desses micro-organismos seria devido a capacidade de crescerem sob concentrações reduzidas de oxigênio nos flocos do lodo (SIEFERT *et al.*, 1978). Esses autores também demonstraram que bactérias fototróficas podem competir com outras bactérias somente sob condições anaeróbias na presença de luz.

Portanto, uma vez que essas condições ocorreram nos reatores do presente estudo, é possível que tais condições tenham contribuído para a detecção de *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodospirillum centenum* e estas estariam envolvidas na remoção de matéria orgânica (ácidos graxos de cadeia curta) ainda presente no efluente anaeróbio.

As bandas 7, 15 e 21 foram encontradas em todos os reatores, com exceção do R2-24h e apresentaram sequências próximas a *Thermomonas* sp. As bactérias desse gênero são gram-negativas e algumas espécies foram isoladas de reatores desnitrificantes (MEGAERT *et al.*, 2003).

A banda 8 foi encontrada somente no R1-24h e apresentou sequência próxima a *Methylomonas* sp. As bactérias desse gênero são metanotróficas obrigatórias que usam metano ou metanol como fonte de carbono, e foram isoladas de sedimentos de lagos de água doce e rios, lodos ativados e de águas residuárias (BRENNER *et al.*, 2005a e b).

A bandas 1, presente somente no R1-24h e a banda 12, presente no R1-12h e R2-24h, apresentaram sequências próximas a sequência de *Firmicutes*. Os membros desse filo são aeróbios, facultativos ou anaeróbios estritos e alguns membros são termófilos e/ou halófilos. Dentre os representantes mais comuns encontram-se as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (ATLAS & BARTHA, 1997).

As bandas 3 e 4, presentes somente no R1-24h, apresentaram sequências próximas com *Lysobacter* sp e *Lysobacter brunescens*, respectivamente, essas bactérias são gram-negativas, aeróbias e quimiorganotróficas e são capazes de usar nitrato e amônio como fonte de nitrogênio (CHRISTENSEN *et al.*, 1978).

A banda 1, presente somente no R1-12h, apresentou sequência próxima a *Soehngenia saccharolytica*, essa bactéria é mesofílica, anaeróbia, mas aerotolerante e fixadora de nitrogênio molecular. Sulfeto e tiosulfato são pouco utilizados como aceptores de elétrons e geralmente é encontrada em lodo de digestores anaeróbios (PARSHINA *et al.*, 2003).

A banda 16 foi detectada somente no R1-12h e apresentou sequência relacionada com *Bacterioides*, essa bactéria realiza fermentação e é encontrada principalmente no trato gastrointestinal humano, o que justifica sua procedência nas águas residuárias (KIRCHMAN, 2002).

As bandas 6 e 18, presentes no R1-24h e R2-24h, respectivamente, apresentaram sequências relacionadas com sequência de cianobactéria não cultivada. A presença de cianobactérias

também foi observada na microscopia óptica nas amostras dos reatores, nos TDH de 12h e 24h. Segundo Stal (1995), cianobactérias e bactérias fototróficas sulfurosas podem coexistir em ambientes com gradiente de concentração de oxigênio e sulfeto, tais como os biofilmes. Esta coexistência é atribuída ao grau de tolerância ao oxigênio. Contudo, diferente das cianobactérias, as bactérias fototróficas púrpuras ocupam as regiões mais profundas do biofilme devido ao efeito inibidor do oxigênio na síntese dos pigmentos.

A análise de DGGE permitiu observar que a composição da comunidade microbiana foi diferente entre a espuma do reator UASB e as amostras dos reatores R1 e R2. Com relação a presença de bactérias sulfurosas, foi possível observar a presença da sulfobactéria verde *Chlorobium* tanto na espuma do reator UASB, quanto na biomassa dos reatores R1 e R2. Enquanto que no R2-24h, observou-se a presença da sulfobactéria verde *Chloronema giganteum*.

No que se refere a presença de sulfobactérias púrpuras, *Thiorhodovibrio* foi presente na espuma do reator UASB, enquanto que *Chromatium* foi detectada somente no R1-12h. Com relação a presença de sulfobactérias incolores, o gênero *Thiobacillus* foi detectado somente na espuma do reator UASB. Além disso, a presença de bactérias púrpuras não sulfurosas *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum centenum* e *Rhodocista pekingensis* também foram detectadas somente no R1 e R2.

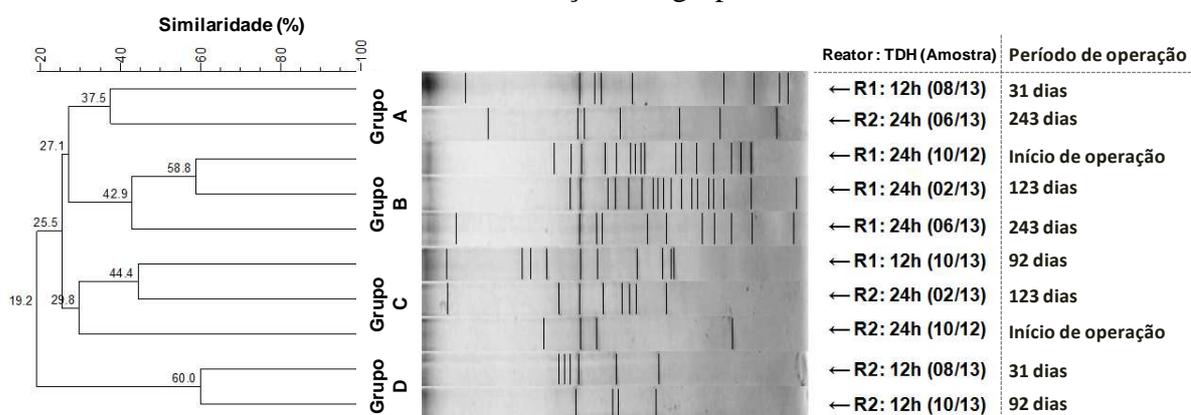
Diante disso, foi possível observar que houve diferença na composição da comunidade microbiana entre a espuma do reator UASB e as amostras dos reatores R1 e R2. Provavelmente, essa diferença ocorreu em função da influência do TDH e do oxigênio, já que no decantador do reator UASB o TDH foi de 2h e nos reatores R1 e R2, os TDH testados foram de 24h e 12h, respectivamente. Além disso, a superfície do decantador do reator UASB ficava exposta o que permitia o contato da espuma com o oxigênio, diferente dos reatores R1 e R2 que permaneciam tampados. Assim, a composição da comunidade microbiana das amostras de espuma do decantador do reator UASB e de espuma do R2-24h foram diferentes, possivelmente devido a influência do TDH e do oxigênio.

6.2.3 Comparação do perfil de bandas da comunidade bacteriana de cada reator

Os perfis populacionais obtidos no DGGE com as amostras dos reatores R1 e R2 de cada fase operacional (TDH de 24h e 12h) foram comparados utilizando o programa BioNumerics. Para

avaliar a dinâmica da comunidade bacteriana, durante as fases operacionais dos reatores, foi calculada a similaridade entre cada amostra e a partir dessa análise foi gerado um dendrograma indicando os coeficientes de similaridade entre os perfis resultantes. A análise de agrupamento separou as amostras em grupos que compartilharam características semelhantes (perfis de conjuntos de bandas) a partir de uma matriz de similaridade que foi gerada da matriz de presença e ausência de bandas obtida dos dados do DGGE (Figura 6.12).

Figura 6.12 - Dendrograma do perfil da comunidade bacteriana do DGGE dos reatores 1 e 2, nas duas diferentes fases operacionais (TDH de 24h e 12h). À direita contém os dados quanto a especificação do reator, TDH e amostra; à esquerda indica a porcentagem de similaridade e identificação dos grupos.



Com base na análise de agrupamento do perfil de bandas do DGGE da Figura 6.12 foram identificados quatro grupos distintos com 19,5% a 27,1% de similaridade. O grupo A corresponde ao agrupamento do R1-12h (08/13) e R2-24h (06/13), o grupo B é referente ao agrupamento das amostras 10/12 e 02/13 e 06/13 do R1-24h, enquanto que o grupo C corresponde ao R1-12h (10/13) e R2-24h (02/13 e 10/12) e o grupo D indica o agrupamento das amostras 08/13 e 10/13 do R2-12h.

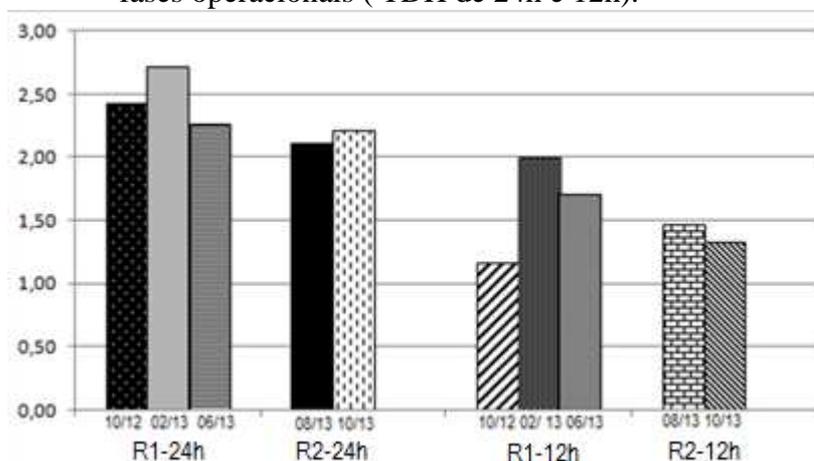
Como é possível observar na figura 6.12, o grupo D apresentou maior porcentagem de similaridade (60%) entre as amostras 08/13 e 10/13 do R2, ou seja, o curto intervalo de dois meses entre as coletas, no TDH de 12h, foi a condição que apresentou menor influência na mudança do perfil da comunidade bacteriana. Considerando o TDH de 24h, no R1 (preenchido por anel plástico), essa condição também pode ser observada no agrupamento das amostras 10/12 e 02/13 que, apesar do intervalo entre a coleta das amostras ter sido maior, de cinco meses, as amostras apresentaram 58,8% de similaridade e 42,9% de similaridade dessas amostras com a amostra referente ao dia 06/13.

Por outro lado, ao analisar o grupo C, referente ao R2 (sem meio suporte) no TDH de 24h, a amostra 10/12 apresentou apenas 29,8% de similaridade com a amostra 02/13, indicando que houve uma mudança considerável no perfil da comunidade bacteriana entre esses períodos. Portanto, a presença do meio suporte no R1 favoreceu maior estabilidade da comunidade bacteriana, quando comparado com o R2, no qual não havia meio suporte.

Na fig. 6.12 é possível observar diferença na estrutura da comunidade bacteriana da amostra do R1-24h (grupo B) quando comparada com a amostra do R2-24h (grupo C), isso sugere que a ausência do meio suporte ocasionou uma seleção e adaptação das bactérias. Além disso, o perfil de DGGE do grupo C referente a amostra do R1-12h (anéis plásticos) não foi similar ao perfil obtido no grupo D, correspondente a amostra do R2-12h (biobob), indicando que diferentes meios suportes selecionaram uma comunidade bacteriana distinta.

O índice de Shannon foi calculado para avaliar a diversidade de bactérias presentes nas amostras dos reatores, nas diferentes fases operacionais (TDH de 24h e 12h). Na figura 6.13, o índice de Shannon mostra as diferenças da diversidade da comunidade bacteriana dos reatores.

Figura 6.13 - Índice de Shannon das amostras dos reatores 1 e 2 nas duas diferentes fases operacionais (TDH de 24h e 12h).



Legenda: R1-24: amostras do reator 1 preenchido por anéis plásticos, no TDH de 24h.

R1-12: amostras do reator 1, preenchido por anéis plásticos, no TDH de 12h.

R2-24: amostras do reator 2, sem meio suporte, no TDH de 24h.

R2-12: amostras do reator 2, preenchido por biobob, no TDH de 12h.

Conforme figura 6.13 foi possível observar que a amostra 2 do R1 no TDH de 24h, apresentou maior índice de Shannon (2,72) e portanto, maior diversidade bacteriana em relação as outras amostras do mesmo período, bem como as amostras do R1 no TDH de 12h. Além disso, as três amostras do R1, no TDH de 24h apresentaram os maiores índices de

diversidade, quando comparado com as amostras do R1, no período de 12h e do R2 em ambos os períodos.

Considerando que o R1, em ambos os períodos, foi preenchido com o mesmo material suporte (anel plástico) é possível verificar um ligeiro decaimento do índice de diversidade, quando o R1 foi operado com TDH=12h. Portanto, a diminuição do TDH no reator pode ter tido influência sobre a diversidade de bactérias no biofilme do R1, uma vez que no TDH de 24h, pode ter favorecido maior retenção de micro-organismos no anel plástico, quando comparado com o TDH de 12h.

Por outro lado, quando se estabelece uma comparação entre o R1 e R2, no TDH de 24h, foi possível observar a influência do meio suporte na diversidade bacteriana, uma vez que nesse período, a média do índice de Shannon nas amostras do R1, preenchido por anel plástico, foi de $2,47 \pm 0,23$, maior do que a média do R2 ($2,16 \pm 0,07$), no mesmo TDH de 24h, porém, sem meio suporte. Portanto, a diversidade bacteriana foi maior no R1, no qual a biomassa cresceu aderida, quando comparado com o R2, no qual a biomassa cresceu de forma dispersa.

No que se refere a influência do tipo de material suporte na diversidade bacteriana, foi possível analisar que, ao comparar os reatores R1 e R2, no TDH de 12h, o R1 contendo anel plástico apresentou valores médios maiores do que o R2 (R1: $1,62 \pm 0,42$ e R2: $1,40 \pm 0,09$) e portanto, pode-se inferir que o anel plástico permitiu o estabelecimento de um biofilme contendo maior diversidade bacteriana do que o biobob (espuma de poliuretano).

Estudo realizado por Motteran (2013), na caracterização da comunidade microbiana de um reator anaeróbio observou, por meio do índice de Shannon, que o material suporte é um fator importante na seleção microbiana. Missagia (2010) realizou estudo das comunidades microbianas em filtros biológicos percoladores (FBP) contendo quatro tipos de meio suporte e os índices de diversidade de Shannon (H') encontrados mostraram maior diversidade bacteriana no FBP preenchido por escória, seguida pela espuma de poliuretano, anéis plásticos, e por último as aparas de conduíte.

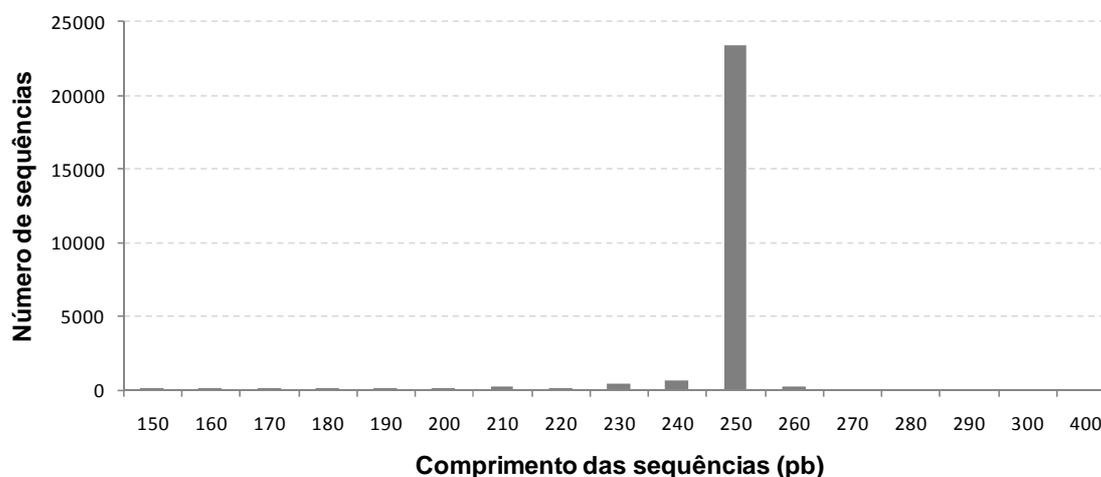
Portanto, esses dados diferem dos dados do presente estudo, no qual maior diversidade foi encontrada no biofilme formado sobre os anéis plásticos quando comparada com o Biobob (espuma de poliuretano).

6.2.4 Análise da composição da comunidade microbiana pela técnica de pirosequenciamento- 454.

Essa análise foi feita com as amostras de biofilme e espuma, coletada dos reatores R1 e R2 no TDH de 24 horas, respectivamente, e com as amostras do biofilme dos dois reatores no TDH de 12 horas. Portanto, será apresentada uma comparação entre os reatores com o intuito de verificar a influência do tempo de detenção hidráulica e do meio suporte na composição e estrutura da comunidade microbiana desenvolvida nos reatores.

O pirosequenciamento das amostras dos reatores resultou em um total de 25.559 sequências (somando as quatro amostras). No histograma de distribuição do comprimento das sequências, observou-se que a maior parte possuía 250 pares de bases (Figura 6.14).

Figura 6.14 - Histograma de distribuição do comprimento das sequências obtidas.



Dentre as sequências selecionadas, cerca de 4000 a 9300 foram atribuídas para cada amostra (tabela 6.5), sendo que ao todo foram definidas 821 UTOs (Unidade Taxonômica Operacionais). As UTOs foram definidas agrupando-se as sequências de acordo com a similaridade entre elas. Optou-se por trabalhar com as UTOs a um nível de similaridade igual a 97%, uma vez que sequências que apresentam similaridade igual ou superior a este valor podem ser consideradas como pertencentes à mesma espécie (GEVERS *et al.*, 2005).

Tabela 6.5 - Quantidade de sequências e UTOs atribuídas para cada amostra.

Amostra	Tempo de detenção hidráulica	Sequências	UTOs (similaridade 97%)
Biofilme do anel plástico do R1	24h	4566	326
Escuma do R2	24h	7614	241
Biofilme do anel plástico do R1	12h	4035	403
Biofilme do biobob do R2	12h	9344	329

Na tabela 6.6 são apresentados os índices de diversidade determinados no nível de 97% de similaridade para as amostras analisadas dos reatores.

Tabela 6.6 - Índices de diversidade determinados no nível de 97% de similaridade, nas amostras dos reatores R1 e R2

Índice	R1-24h	R2-24h	R1-12h	R2-12h
Dominância	0,06	0,06	0,05	0,05
Equitabilidade	0,66	0,65	0,70	0,68
Shannon	3,81	3,57	4,22	3,92

Um dos índices analisados foi a dominância, que expressa o número de indivíduos de uma determinada espécie em relação ao número de indivíduos de todas as espécies encontradas. Os valores do índice de dominância foram baixos, entre 0,05 e 0,06 (tabela 6.6), indicando uma distribuição mais equânime dos taxóons da comunidade microbiana em cada amostra analisada, ou seja, valores próximos de 0 indicam a presença equânime de todos os táxons, enquanto valores próximo de 1 indicam o domínio de um taxón na comunidade microbiana.

O índice de equitabilidade expressa a maneira pela qual o número de indivíduos está distribuído entre diferentes espécies, ou seja, indica se as diferentes espécies possuem abundância (em termos de números de indivíduos) semelhantes ou divergentes (GOMES, 2004). Os valores do índice de equitabilidade variaram de 0,65 a 0,70, portanto, ocorreu variação na distribuição da comunidade microbiana uma vez que valores próximos de 1 indicam altas variações.

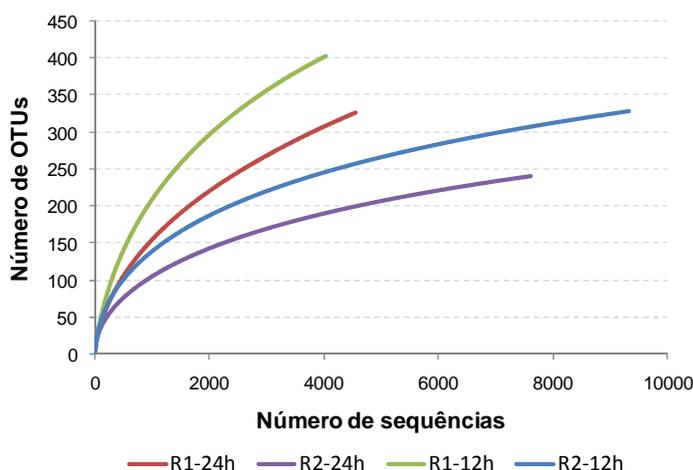
Com relação as medidas de diversidade, essas medidas levam em consideração tanto o número de espécies quanto a abundância relativa (equitabilidade) de cada uma delas. O índice

utilizado nesse estudo foi o índice de Shannon-Wiener. Os valores obtidos foram entre 3,57 a 4,22, indicando, portanto, significativa riqueza das amostras, pois quanto maior o valor do índice, maior o número de táxons na comunidade microbiana. Assim, o maior índice de Shannon obtido foi para amostra do biofilme do R1-12h (4,22), seguido pelo biofilme R2-12h (3,92), biofilme do R1-24h (3,81) e espuma do R2-24h (3,57).

No geral, a diversidade foi maior no reator preenchido com anéis plásticos quando comparado com o reator preenchido com biobob, portanto, o meio suporte anel plástico é mais indicado do que o biobob, já que favoreceu uma comunidade mais diversa e que poderia realizar a oxidação biológica de sulfeto e a degradação de compostos orgânicos no reator.

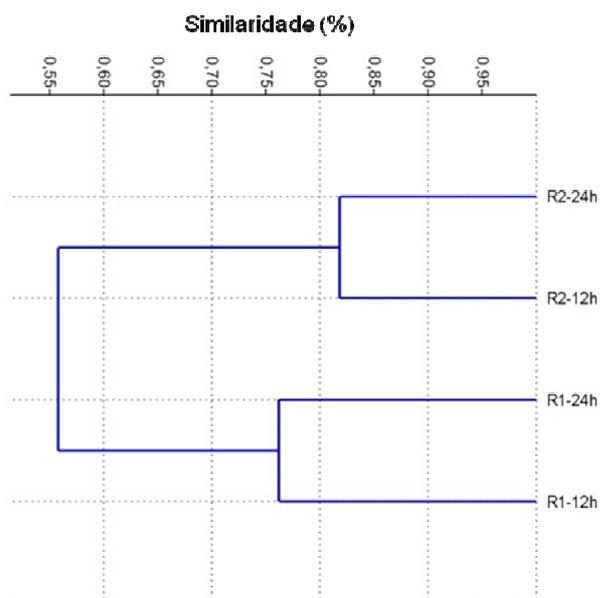
Para estimar a riqueza, utilizou-se a curva de rarefação. Os dados da curva de rarefação foram plotados em função do número de seqüências analisadas em cada amostra, conforme figura 6.15. Ao comparar as amostras dos reatores observou-se maior riqueza no biofilme do R1-12h e menor riqueza na espuma do R2-24h. Essa curva expressa a riqueza máxima esperada no ambiente quando há estabilização da curva, porém, em todas as amostras analisadas não foi observada a estabilização da curva, assim, espera-se que haja mais espécies do que aquelas analisadas pelo pirosequenciamento. Na figura 6.15 é possível observar que as amostras do R2-24h e R2-12h, que recuperaram maior número de seqüências, estão mais próximas da estabilização da curva quando comparadas com as amostras do reator 1.

Figura 6.15 - Curva de rarefação definida pela similaridade de 97% das seqüências das amostras do biofilme R1-24h, espuma R2-24h, biofilme R1-12h e R2-12h, respectivamente.



Para avaliar a similaridade entre as amostras com base na presença/ausência e abundância das espécies utilizou-se o índice de Bray-Curtis apresentado na figura 6.16.

Figura 6.16 - Dendograma baseado na análise de agrupamento do índice Bray-Curtis para as amostras dos reatores, no TDH de 12h e 24h.



Pela análise de agrupamento das amostras gerada a partir desse índice de similaridade, foi possível observar dois agrupamentos distintos, um grupo do reator 1 e outro do reator 2, conforme figura 6.16. No dendograma verifica-se o coeficiente de similaridade de 55% entre as amostras do reator 1 e do reator 2, indicando que as comunidades microbianas entre os reatores foram diferentes. É importante ressaltar que apesar do agrupamento entre os reatores R2-24h e R2-12h, há um diferencial nos reatores com relação ao meio suporte, uma vez que no R2-14h não continha meio suporte, enquanto que no R2-12h o meio suporte era o biobob.

Por outro lado, a comparação entre as amostras de um mesmo reator, nos diferentes tempos de detenção hidráulica, mostra que as amostras do biofilme do reator 1 apresentaram coeficiente de similaridade próximo de 75%. Enquanto que as amostras do reator 2 apresentaram maior similaridade entre si, com valor de coeficiente de similaridade de 80%, apesar de serem amostras do biofilme e da espuma, no TDH de 12h e 24h, respectivamente.

Portanto, os valores sugerem que as amostras da comunidade foram mais similares entre si dentro de um mesmo reator, e não houve influência do TDH analisando o coeficiente de similaridade em cada reator (R1 e R2). Além disso, a presença do material suporte biobob no R2 não influenciou na composição da comunidade microbiana, quando comparado com o R2, sem material suporte.

O índice de Bray-curtis considera riqueza e uniformidade, porém cada UTO é distinta na comparação entre amostras, dessa forma a similaridade entre as amostras do R1 e entre as amostras do R2 foi devido, principalmente, à riqueza e semelhanças de UTOs atribuídas em cada amostra.

6.2.5 Caracterização da comunidade microbiana pela análise de pirosequenciamento

A classificação taxonômica das UTOs foi realizada por meio da ferramenta RDP-Classifer. Foram classificadas 821 UTOs com 97% de similaridade, o número de UTOs por taxon está apresentado na tabela 6.7.

Tabela 6.7 - Número de UTOs classificadas nos diferentes níveis taxonômicos e porcentagem em relação ao total de UTOs (97% de similaridade)

Táxon	Número de UTOs	Porcentagem em relação ao total de UTOs (%)
Filo	820	99,9
Classe	811	98,8
Ordem	789	96,1
Família	769	93,7
Gênero	743	90,5

A caracterização da comunidade microbiana ateu-se a descrição dos principais filios, ordens e gêneros classificados em cada amostra. Especificamente, para descrição dos gêneros foram utilizados aqueles com abundância relativa maior que 0,1%.

Conforme mostra a figura 6.17, os principais filios observados nas amostras dos reatores foram os filios *Synergistetes*, *Proteobacteria*, seguido por *Firmicutes*. No R1-24h, os filios abundantes foram *Synergistetes* e *Euryarchaeota*, do domínio Archaea, enquanto que nas amostras do R2-24h, R1-12h e R2-12h os filios mais abundantes foram *Proteobacteria* e *Synergistetes*.

A tabela 6.8 mostra a abundância relativa dos filios nas amostras dos reatores, nos TDH de 24h e 12h e os filios predominantes destacados em vermelho e azul na tabela 6.8.

Figura 6.17 - Abundância relativa de filo (similaridade 97%) das amostras do R1 e R2, nos TDH de 24h e 12h.

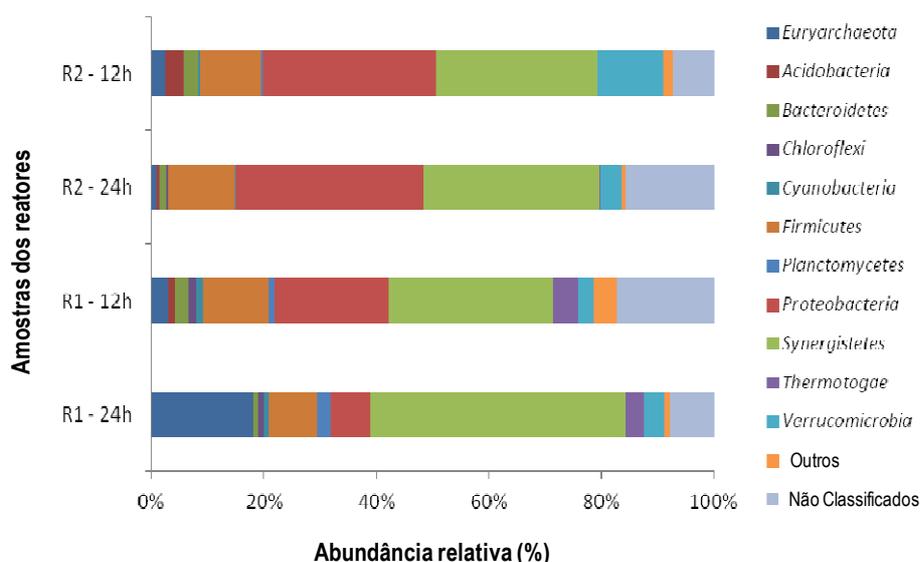


Tabela 6.8 - Abundância relativa (%) dos filos observados nas amostras dos reatores R1 e R2, nos TDH de 24h e 12h

Filos	R1-24h (anel plástico)	R2-24h (sem suporte)	R1-12h (anel plástico)	R2-12h (Biobob)
<i>Synergistetes</i>	45,4	31,3	29,2	28,8
<i>Firmicutes</i>	8,5	11,9	11,8	10,8
<i>Proteobacteria</i>	6,9	33,6	20,4	30,8
<i>Verrucomicrobia</i>	3,6	3,8	2,8	11,6
<i>Thermotogae</i>	3,3	0,1	4,5	0
<i>Planctomycetes</i>	2,5	0,1	0,8	0,3
<i>Chloroflexi</i>	1,2	0,4	1,4	0
<i>Bacteroidetes</i>	0,9	1,0	2,3	2,7
<i>Cyanobacteria</i>	0,7	0	1,3	0,4
<i>Spirochaetes</i>	0,4	0,2	0,4	0,8
<i>OP10</i>	0,2	0	0,2	0,1
<i>WS3</i>	0,1	0,1	2,2	0
<i>Actinobacteria</i>	0,1	0	0,4	0
<i>Fusobacteria</i>	0,1	0	0	0
<i>BRC1</i>	0	0,3	0,8	0,1
<i>Acidobacteria</i>	0	0,6	1,3	3,2
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0	0	0,2	0,6
<i>Chlorobi</i>	0	0	0,1	0
Não classificado	7,9	15,7	17,2	7,3

No domínio Archaea, o filo *Euryarchaeota* foi abundante no R1-24h, seguido pelo R1-12h, R2-12h e R2-24h. Nesse filo predominam as espécies tolerantes a condições ambientais adversas, sendo representado por arqueias metanogênicas, halófilas extremas e

termoacidófilas. Especificamente as arqueias metanogênicas, durante a digestão anaeróbia, utilizam acetato ou hidrogênio para produção de metano (BROCHIER-ARMANET *et al.*, 2008).

Com relação ao domínio Bacteria, o filo *Synergistetes* foi o mais abundante entre as amostras dos reatores, com maior abundância relativa no R1-24h, seguido pelo R2-24h, R1-12h e R2-12h. Os membros desse filo têm sido encontrados em diferentes habitats tais como, sistemas de tratamento de esgotos, solos e poços de óleo, além de estarem envolvidos em doenças periodontais em humanos (BILAK *et al.*, 2009). Segundo Riviere *et al.* (2009), os membros do filo *Synergistetes* podem desenvolver importante papel na digestão anaeróbia, já que podem degradar aminoácidos e produzir ácidos graxos de cadeia curta e sulfato para as metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato.

O filo *Firmicutes* também foi abundante nas amostras dos reatores e os membros desse filo estão envolvidos na digestão anaeróbia. O filo *Firmicutes* foi mais abundante na escuma do R2-24h, seguido pelo biofilme do R1-12h, R2-12h e R1-24h. Na análise de DGGE, as sequências obtidas das amostras do R1-24h, R2-24h e R1-12h apresentaram-se próximas ao filo *Firmicutes*.

Segundo Riviere *et al.* (2009), estes micro-organismos estão envolvidos na digestão anaeróbia do lodo. As bactérias pertencentes a esse filo são sintróficas, capazes de degradar ácidos graxos voláteis e o hidrogênio resultante, pode ser utilizado por metanogênicas hidrogenotróficas em condições anaeróbias. Dentre os representantes do filo *Firmicutes*, estão os membros do gênero *Clostridium* os quais na sua maioria é estritamente anaeróbia, porém algumas espécies são aerotolerantes, com algumas espécies que fermentam açúcares, poliálcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos, purinas e outros compostos orgânicos (MA *et al.* 2013 e SHANKS *et al.* 2013).

Especificamente o filo *Proteobacteria*, em destaque na tabela 6.8, apresentou abundância relativa elevada nas amostras dos reatores, sendo mais abundante no reator 2, no TDH de 24h e 12h, seguido pelo reator 1, no TDH de 12h e 24h, respectivamente. O filo *Proteobacteria* é o maior e mais diverso grupo dentro do domínio Bacteria, esse filo possui seis classes: Delta, Gama, beta, alfa, épsilon e zeta-proteobacteria, com exceção da última, todas as outras classes

estiveram presentes nos reatores, sendo que principalmente delta e gama-proteobacteria estão envolvidas no ciclo do enxofre (MADIGAN *et al.*, 2010).

Além disso, todos os micro-organismos presentes nesse filo são gram-negativos e exibem diversidade muito ampla de mecanismos de produção de energia, contendo espécies quimiolitotróficas, quimiorganotróficas e fototróficas, além de já terem sido encontrados em ambientes óxicos e anóxicos. Estudo realizado por Fernandez *et al* (2008) demonstrou que na análise da comunidade microbiana do biofilme de um reator UASB, tratando esgotos domésticos, o filo predominante foi *Proteobacteria* (alfa), seguido pelos filios *Firmicutes* e *Bacteroidetes*.

Com relação aos filios *Planctomycetes* e *Verruimicrobia*, ambos foram encontradas nas amostras dos reatores desse estudo. De forma similar, esses filios também foram recuperadas de aquíferos, sedimentos marinhos e digestores anaeróbios (BRIEE *et al.*, 2007) o que demonstra a versatilidade dos membros desses filios em ocuparem diversos substratos. Os membros do Filo *Planctomycetes* são ubíquos e já foram encontrados em uma ampla gama de ambientes, como por exemplo, solos, ambientes de água doce, sedimentos oceânicos e sistemas de tratamento de efluentes (FUERST & SAGULENKO, 2011).

O filo *Chloroflexi* foi encontrado nos reatores, com exceção do R2-12h, e os membros desse filo inclui bactérias verdes não sulfurosas. São organismos estritamente anaeróbios e fototróficos, filamentosos que podem ser encontrados em ambientes aquáticos que contenham enxofre como águas termais e sedimentos de lagos e rios. Além disso, são encontrados em estações de tratamento de esgotos, sendo muito comuns em sistemas de lodos ativados (KRAGELUND *et al.*, 2011)

Resultados similares foram encontrados por Sinischachi (2014) que utilizando a técnica de pirosequenciamento detectou em lodo de UASB, tratando esgoto doméstico, os seguintes filios mais abundantes: *Synergistetes* (53%), *Firmicutes* (13%), *Euryarchaeota* (*Methanobacterium*) (8%), e *Proteobacteria* (1%). Portanto, a comunidade microbiana encontrada no presente estudo no reator 1 (anel plástico) com TDH de 24 horas se assemelhou a comunidade encontrada em reator UASB, sugerindo que as etapas de degradação anaeróbia da matéria orgânica (fermentação, acidogênese, acetogênese e metanogênese) estavam ocorrendo no R1 nesta condição, além da oxidação de sulfeto.

Por outro lado, os resultados obtidos no R2, que demonstraram maior abundância do filo *Proteobacteria*, são similares aos resultados obtidos por Lee *et al.* (2012) que caracterizaram a comunidade bacteriana de sete digestores anaeróbios e demonstraram que a comunidade foi formada por 21% de *Proteobacteria*, 20% de *Bacteroidetes*, 18% de *Firmicutes* e 5% de *Chloroflexi*. Enquanto que os resultados obtidos por Hu *et al.* (2012) referente a análise da comunidade microbiana de 16 amostras de lodo de tanques de aeração de diferentes sistemas de lodos ativados, tratando águas residuárias, demonstraram maior abundância relativa do filo *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* nas amostras de lodo.

Estudo realizado por Lopes (2013) na descrição da microbiota relacionada as transformações do enxofre em sedimentos de manguezais, demonstrou que no domínio Archaea, o filo mais abundante foi *Euryarchaeota* (34%-62%) e no domínio Bacteria os filios mais abundantes foram *Proteobacteria* (46%-59%) e *Bacteroidetes* (12%-29%). Conforme apresentado, os resultados do presente estudo foram similares com aqueles reportados na literatura. Rezende *et al.* (2013) investigou a comunidade microbiana presente em reator UASB tratando esgoto doméstico, e verificou alta diversidade de bactérias com metabolismo especializado na remoção de DQO, pertencentes principalmente aos filios *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, além da presença de arqueias da ordem *Methanosarcinales*, que também foram predominantes no lodo do reator UASB.

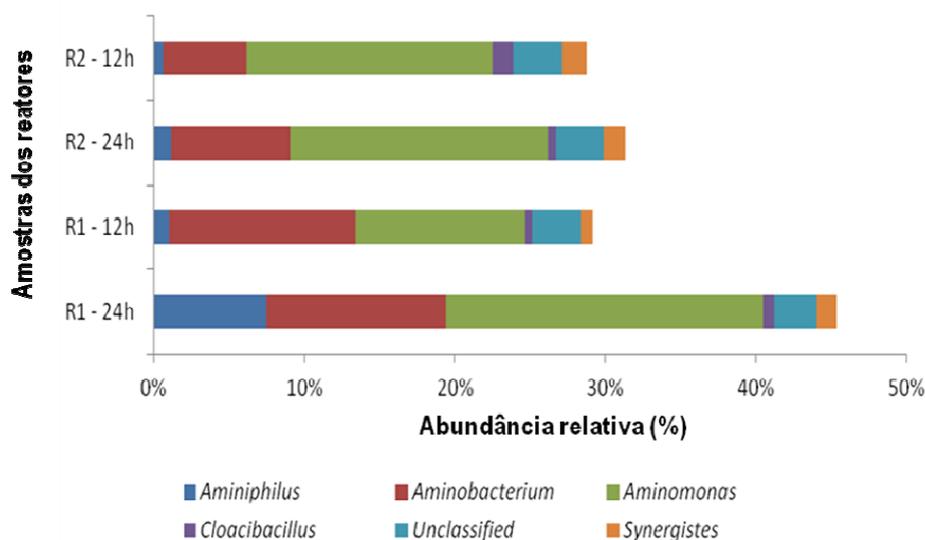
No presente trabalho, o monitoramento da DQO foi realizado somente no TDH de 24h e a eficiência de remoção de DQO filtrada foi baixa nos reatores, sendo de 21% no R1 e 7% no R2. Apesar disso, os resultados de pirosequenciamento das amostras de biofilme e espuma mostraram uma variedade de micro-organismos que poderiam estar envolvidos nas etapas da degradação anaeróbia da matéria orgânica remanescente, tanto no TDH de 24h quanto no TDH de 12h.

Com relação a influência do TDH na abundância dos filios *Synergistetes* e *Proteobacteria*, foi possível observar maior abundância do filo *Synergistetes* no R1-24h com diminuição da abundância desse filo em função da redução do TDH para 12h no R1-12h. A influência do TDH também foi observada no reator 2, com relação ao filo *Proteobacteria*, que apresentou maior abundância no R2-24h, porém com a redução do TDH para 12h, houve diminuição da abundância desse filo no R2-12h.

No que se refere a influência do meio suporte nos filos mais abundantes nos reatores, foi possível observar que os filos *Euryarchaeota* e *Synergistetes* foram mais abundantes no R1-24h, contendo anéis plásticos, do que no R2-24h, sem meio suporte. Além disso, o tipo de material suporte também influenciou na abundância dos filos *Proteobacteria* e *Synergistetes*, uma vez que maior abundância do filo *Synergistetes* foi encontrada no R1-12h contendo anéis plásticos e o filo *Proteobacteria* foi mais abundante no R2-12h preenchido por biobob.

Com relação as ordens, as principais observadas nas amostras dos reatores foram *Synergistales*, *Methanobacteriales*, *Clostridiales*, representantes dos filos *Synergistetes*, *Euryarchaeota* e *Firmicutes*, respectivamente. Enquanto as ordens *Xanthomonadales* e *Neisseriales*, pertencentes ao filo *Proteobacteria*, também foram abundantes no reator 2. No R1-24h, as ordens mais abundantes foram *Synergistales* (45,4%) e *Methanobacteriales* (17,1%), enquanto no R1-12h, a ordem mais abundante foi *Synergistales* (29,2%). No R2, as ordens mais abundantes foram *Synergistales* (31,3%) seguida pela ordem *Xanthomonadales* (de 12 a 13%). A ordem *Synergistales* foi a ordem mais abundante nos reatores e a abundância relativa dos gêneros encontrados nessa ordem é apresentada na figura 6.18

Figura 6.18 - Abundância relativa dos gêneros da ordem *Synergistales* (similaridade 97%) presentes nas amostras do R1 e R2, nos TDH de 24h e 12h.



Conforme figura 6.18, os gêneros *Aminiphilus*, *Aminobacterium*, *Cloacibacillus* e *Synergistes* foram abundantes nas amostras dos reatores. Os membros desses gêneros são bactérias mesofílicas e anaeróbias estritas, com capacidade hidrolítica. Enquanto que o gênero

Aminomonas, também pertencente a esta ordem, possui capacidade de produzir acetato e foi mais abundante na amostra do R1-24h seguido pelo R2-24h, R2-12h e R1-12h, portanto, é possível observar que a redução do TDH diminuiu a abundância relativa desses gêneros.

Dentre os gêneros encontrados da ordem *Synergistales*, o gênero *Aminobacterium* possui um membro, *Aminobacterium colombiense*, que foi isolado de um lodo anaeróbio, tratando águas residuárias, essa espécie quando cultivada com a metanogênica hidrogenotrófica *Methanobacterium formicicum*, torna-se capaz de oxidar glutamato, valina e metionina (BAENA *et al.*, 1998).

Com relação as arqueias, ordem *Methanobacteriales* foi detectada em maior abundância no R1-24h. As arqueias dessa ordem são metanogênicas fisiologicamente especializadas na conversão e crescimento em uma variedade de substratos, tais como H₂/CO₂, acetato, metanol, etanol, aminas metiladas e piruvato. Os gêneros detectados foram *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*, sendo que o primeiro foi mais abundante no biofilme do R1- 24h, (17,0%) seguido por *Methanobrevibacter* (0,1%). Na espuma do R2-24h foi encontrada somente o gênero *Methanobacterium* em baixa proporção (0,9%). Enquanto que no R1-12h e R2-12h, a maior abundância relativa de arqueias foi de *Methanobacterium* (1,7%) seguido por *Methanobrevibacter* (0,1%).

As arqueias metanogênicas estiveram presentes nos reatores, com maior abundância no biofilme do R1-24h, seguido pelo biofilme do R1-12h, biofilme R2-12h e espuma R2-24h. Especificamente no reator 1, a redução do TDH de 24h para 12h diminuiu a abundância de arqueias no reator, indicando que o menor TDH não foi favorável ao desenvolvimento das arqueias metanogênicas, que são de crescimento lento e provavelmente não houve tempo suficiente para se estabelecerem no reator 1 com TDH de 12h. Já no reator 2, houve um ligeiro aumento da abundância relativa do gênero *Methanobacterium*, quando houve redução do TDH=24h para o TDH=12h.

No que se refere a influência do meio suporte, no TDH=24h foi possível observar que a presença dos anéis plásticos no R1 propiciou maior abundância de arqueias metanogênicas, quando comparado com o R2, sem meio suporte. Enquanto que comparando os meios

suportes no TDH=12h, observou-se que no R1, os anéis plásticos propiciaram maior abundância de arqueias metanogênicas do que o biobob no R2.

No que se refere a ordem *Clostridiales*, foram identificados gêneros de bactérias hidrolíticas tais como *Clostridium* no biofilme do R1-24h (0,2%), escuma do R2-24h (0,1%), biofilme do R1-12h (0,2%) e R2-12h (0,2%) e *Eubacterium*, que foi presente somente na amostra do biofilme do R1-24h com abundância relativa de 0,1%. Ambos os gêneros são constituídos por bactérias anaeróbias, sendo que as bactérias do gênero *Clostridium*, devido a sua versatilidade metabólica, podem estar envolvidas na fermentação de aminoácidos e açúcares nos reatores. Os membros do gênero *Eubacterium* são produtores de proteases para degradação de proteínas a aminoácidos.

Na ordem *Clostridiales* também foram abundantes os gêneros *Phascolarctobacterium*, presente no biofilme do R1-24h (0,2%), *Acidaminococcus* presente no biofilme do R2-12h (0,6%) e na escuma do R2-24h (0,3%) e *Anaeroarcus* presente em maior abundância no biofilme do R2-12h (0,6%), seguido pela escuma do R2-24h (0,4%) e biofilme do R1-24h (0,2%).

Os gêneros *Clostridium* e *Eubacterium*, pertencentes a ordem *Clostridiales*, além de poderem realizar a hidrólise da matéria orgânica, também podem estar envolvidos juntamente os gêneros *Phascolarctobacterium*, *Acidaminococcus* e *Anaeroarcus* na produção de uma variedade de alcoois e ácidos orgânicos, tais como ácido propiônico e ácido acético nos reatores.

Além disso, os gêneros *Propionispira* e *Succnispira*, pertencentes a ordem *Clostridiales*, podem estar envolvidos na formação de acetato a partir de CO₂ e H₂. O gênero *Propionispira*, foi presente com maior abundância no biofilme do R2-12h (1,0%) e em menor abundância no R1-24h (0,2%) e o gênero *Succnispira* presente somente no biofilme do R1-24h apresentou abundância relativa de 0,7%.

O gênero *Soehngenia*, da ordem *Clostridiales*, foi presente na escuma do R2-24h, com abundância relativa de 0,2%. Na análise do DGGE também foi detectada a presença do gênero *Soehngenia*, na amostra R1-12h. As bactérias pertencentes a esse gênero são

mesofílicas, anaeróbias, mas aerotolerantes, capazes de fixar o nitrogênio molecular (PARSHINA *et al.*, 2003).

Os membros da ordem *Clostridiales* apresentaram maior abundância no biofilme do R2-12h, seguido pela espuma do R2-24h e biofilme R1-24h. A maior abundância dos membros dessa ordem foram no R2 seguido pelo R1-24h. No R2, o tempo de detenção hidráulica de 12h favoreceu maior abundância desses gêneros, quando comparado com o TDH de 24h. Enquanto que no R1, a diminuição do TDH de 24h para 12h afetou a abundância desses gêneros, uma vez que no TDH=12h os mesmos não foram abundantes.

Com relação a influência do meio suporte, observou-se que o biobob permitiu maior abundância dos membros da ordem *Clostridiales*. Por outro lado, o anel plástico no R1-24h apresentou menor abundância dessas bactérias, quando comparado com o R2-24h, no qual o crescimento desses micro-organismos teria ocorrido de forma dispersa.

Xu *et al.* (2012), investigaram a comunidade microbiana envolvida na digestão anaeróbia de reator tratando resíduos de alimentos, o gênero *Clostridium* foi predominante na comunidade quando o TDH foi de 24h, quando houve mudança para o TDH de 48h, houve predominância do gênero *Lactobacillus*, cujo metabolismo é fermentativo com produção de ácido lático. Além disso, no estudo realizado por Cheng *et al* (2014), na análise da comunidade microbiana envolvida na fermentação de resíduos de alimentos, *Clostridium*, *Prevotella*, *Mitsuokella* e *Treponema* foram os micro-organismos mais abundantes com capacidade proteolítica.

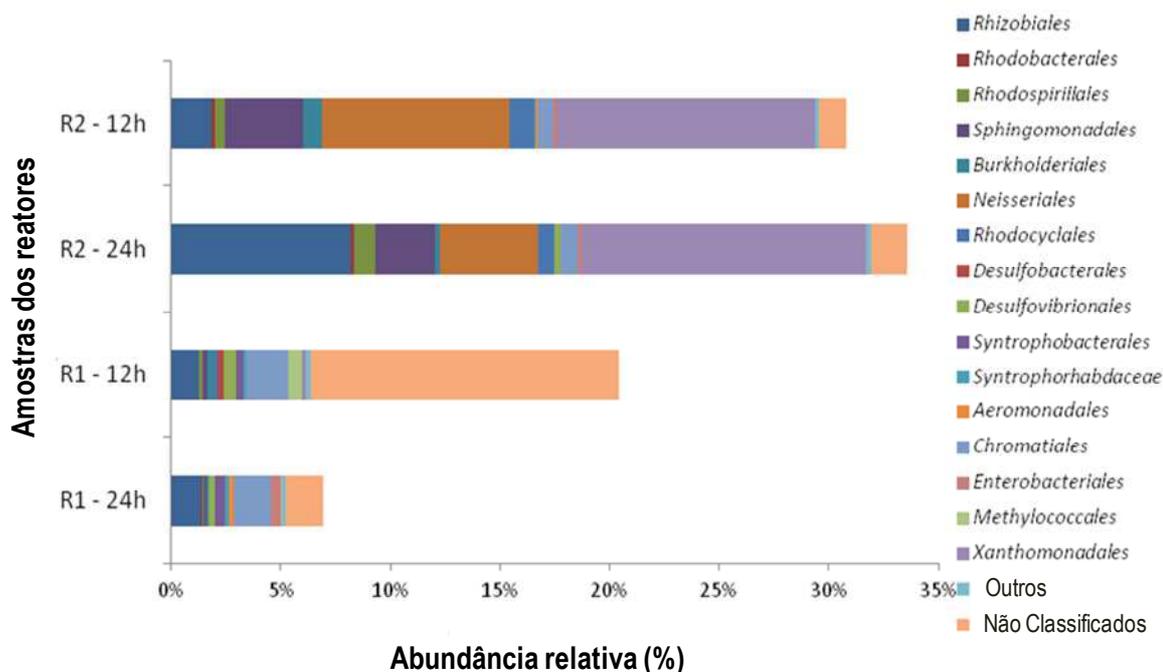
A ordem *Planctomycetales* também foi presente nas amostras dos reatores, sendo que o gênero *Singulisphaera* foi mais abundante no biofilme do R1-24h (1,1%), seguido pelo biofilme do R1-12h (0,3%), espuma do R2-24h (0,1%) e biofilme do R2-12h (0,1%). Os membros do gênero *Singulisphaera* possuem capacidade hidrolítica e são capazes de crescer em condições microaerofílicas.

Nos reatores R1 e R2, a mudança do tempo de detenção hidráulica de 24h para 12h diminuiu a abundância relativa do gênero *Singulisphaera*. No que se refere a influência do meio suporte, foi possível observar que a presença dos anéis plásticos no R1 propiciou maior abundância desse gênero, quando comparado com o R2-12h, contendo biobob.

A ordem *Bacteroidales* foram menos abundantes nos reatores, o gênero *Paludibacter*, representante dessa ordem foi presente com maior abundância no R1-12h (0,5%), seguido pela escuma do R2-24h (0,4%) e R2-12h (0,2%) e o gênero *Bacteroides* também foi presente somente no R2-24h e R2-12h com abundância relativa de 0,3%. Ambos os gêneros são constituídos por bactérias gram-negativas, anaeróbias, quimiorganotróficas, capazes de realizar a fermentação, cujos principais produtos são succinato e acetato.

Com relação ao filo *Proteobacteria*, a figura 6.19 apresenta as principais ordens representativas desse filo, dentre as quais estão em maior abundância nos reatores *Xanthomonadales*, *Neisseriales* e *Rhizobiales*.

Figura 6.19 - Abundância relativa das ordens pertencentes ao filo *Proteobacteria*, presente nos reatores.



Nas ordens *Neisseriales* e *Xanthomonadales* estão presentes bactérias com reconhecida capacidade de realizar desnitrificação, tais como os gêneros *Gulbenkiania* e *Thermomonas*, respectivamente. Esses gêneros foram abundantes nas amostras do reator R2. Na escuma do R2-24h, *Thermomonas* foi mais abundante que *Gulbenkiania* com abundância relativa de 8,0% e 4%, respectivamente. Enquanto que no R2-12h, *Gulbenkiania* foi mais abundante (9,0%) seguida por *Thermomonas*, com 4,9%.

Os resultados obtidos com a análise de DGGE demonstraram que o gênero *Gulbenkiania* esteve presente em todas as amostras nos reatores, nos TDH de 24h e 12h. Os membros desses gêneros são aeróbios, capazes de realizar a redução de nitrato a nitrito. O gênero *Thermomonas* também foi detectado pela análise de DGGE nos biofilmes de R1-24h, R1-12h e R2-12h e as bactérias desse gênero também são capazes de realizar a desnitrificação (TROIS, 2010).

O gênero *Stenotrophomonas*, da ordem *Xanthomonadales*, foi abundante nos reatores R2-24h e R2-12h com abundância relativa de 0,2% e 0,6%, respectivamente. O gênero *Stenotrophomonas* contém bactérias aeróbias, capazes de reduzir o nitrato, mas não são usados como uma fonte de nitrogênio para o crescimento (PEPE *et al.*, 2013).

O gênero *Lysobacter*, da ordem *Xanthomonadales*, foi mais abundante no R2-12h (5,5%), seguido pelo R2-24h (4,1%) e R1-12h (0,1%). Os membros desse gênero compreendem bactérias aeróbias, quimiorganotróficas e a espécie *Lysobacter brunescens* pode utilizar nitrato e amônio como fonte de nitrogênio (CHRISTENSEN *et al.*, 1978). No pirosequenciamento, *Lysobacter* foi menos abundante no R1-24h (0,02%), já na análise de DGGE, o mesmo foi detectado na amostra de biofilme do R1-24h.

As bactérias da ordem *Xanthomonadales* foram mais abundantes no R2-12h e R2-24h, seguido pelo R1-24h e R1-12h. Portanto, houve maior abundância no R2 dos gêneros *Stenotrophomonas* e *Lysobacter*, além disso, a mudança de TDH de 24h para 12h aumentou a abundância dessas bactérias nesse reator, enquanto que no R1, a redução do TDH de 24h para 12h também diminuiu a abundância desses gêneros. Com relação a influência do meio suporte, observou-se que o biobob e a espuma no R2 permitiu maior abundância de *Stenotrophomonas* e *Lysobacter*. Por outro lado, no R1 essas bactérias foram menos abundantes. Portanto, o biobob e a espuma propiciaram maior abundância dessas desnitrificantes, quando comparado com os anéis plásticos.

Durante o período de monitoramento dos reatores no TDH de 12h, as concentrações de nitrato e nitrito foram medidas semanalmente durante dois meses utilizando HPLC. Os resultados mostraram que as concentrações foram baixas, cerca de 0,6 mg/L de nitrato e 0,3 mg/L de

nitrito, e similares entre o afluente e o efluente dos reatores. O monitoramento desses parâmetros não ocorreu nos reatores na fase 1, no TDH de 24h e na fase 3, no TDH de 6h.

A ordem *Rhizobiales* foi presente, tendo sido detectado o gênero *Pseudolabrys*, mas somente no biofilme do R2-12h (0,2%). No biofilme do R1-12h, o gênero *Rhizobium* apresentou abundância relativa de 0,1%, geralmente membros desse gênero são desnitrificantes e capazes de fixar nitrogênio em simbiose com plantas, em associação leguminosas como soja, ervilha, trevo e alfarrobeira (MADIGAN *et al.*, 2010).

Na espuma do R2-24h os gêneros *Roseomonas* e *Azospira*, pertencentes as ordens *Rhodospirillales* e *Rhodocyclales*, respectivamente, apresentaram abundância relativa de 1% no reator. As bactérias desses gêneros são púrpuras não sulfurosas, capazes de reduzir nitrato e são agentes patogênicos de peles e mucosas dos seres humanos (FURUHATA *et al.*, 2008).

Na ordem *Rhodospirillales*, o gênero *Azospirillum* foi abundante na espuma do R2-24h (0,1%). Esse gênero constitui de bactérias desnitrificantes, endofíticas fixadoras de nitrogênio e a literatura reporta sua associação com algumas variedades de cana (BISWAS *et al.*, 2014). Além disso, as bactérias do gênero *Azonexus*, pertencente a ordem *Rhodocyclales*, são desnitrificantes e esse gênero foi abundante no biofilme do R1-24h com abundância relativa de 0,1%. A espécie *Azonexus fungiphilus*, foi isolada da rizosfera de uma planta presente no solo de cultivo de arroz e desempenha o papel de fixação de nitrogênio (CHOU *et al.*, 2008).

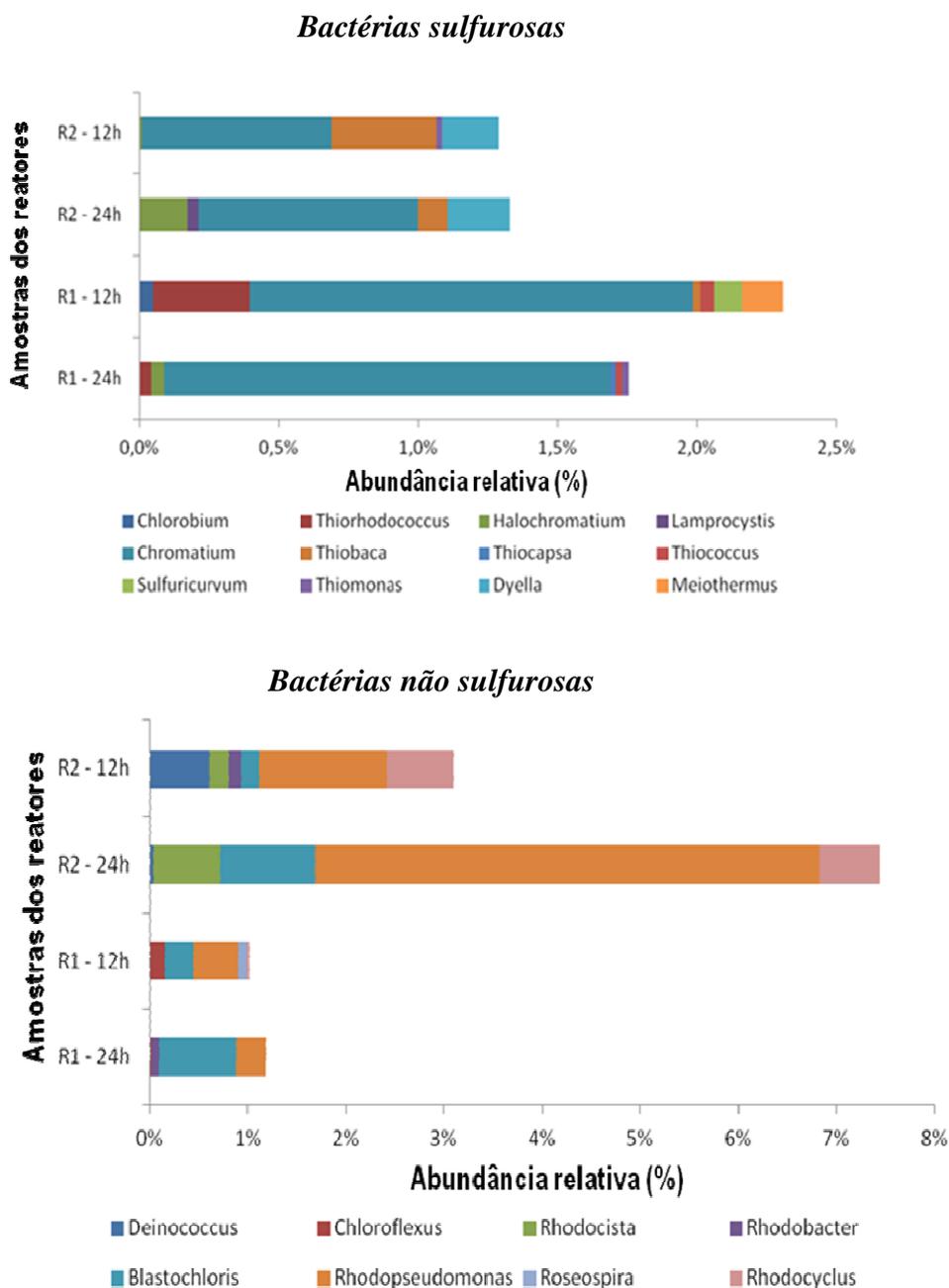
6.2.6 Gêneros de bactérias sulfurosas e não sulfurosas presentes nos reatores R1 e R2, nos tempos de detenção hidráulica de 24h e 12h.

A oxidação biológica de sulfeto pode ser parcial a S⁰ ou completa a sulfato, pode ocorrer em condições aeróbias, anóxicas ou anaeróbias, com oxigênio, nitrato ou dióxido de carbono atuando, respectivamente, como aceptores de elétrons. Ampla variedade de micro-organismos é capaz de oxidar, reduzir e desproporcionar espécies de enxofre (ELSHAHED *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos com o pirosequenciamento apresentaram sequências de bactérias sulfurosas e não sulfurosas (Figura 6.20) presentes nos reatores, e ressalta-se que as bactérias sulfurosas púrpuras foram mais abundantes no R1 (preenchido com anéis plásticos) e que as bactérias purpuras não-sulfurosas foram mais abundantes no R2 (sem meio suporte), na

escuma formada. Na figura 6.20 é possível observar no grupo das bactérias sulfurosas, que o gênero *Chromatium* foi abundante nos reatores, sendo mais dominante no R1 (com anéis plásticos). Especificamente, o gênero *Chromatium* também foi detectado pela análise de DGGE, com 97% de similaridade, nas amostras de escuma do R2-24h e do biofilme do R1-12h. Além disso, na microscopia óptica também foi possível observar a morfologia da bactéria *Chromatium* nos reatores nos TDH de 12h e 24h.

Figura 6.20 - Abundância relativa dos gêneros de bactérias não sulfurosas e sulfurosas nos reatores 1 e 2, nos TDH de 24h e 12h.



Chromatium, pertencente a ordem *Chromatiales*, tem sido observada em tapetes microbianos e nesses ambientes desenvolve-se em camadas anóxicas ricas em sulfeto, na presença de luz. Nos tapetes, *Chromatium* desenvolve abaixo do topo da camada verde, geralmente constituída por outros micro-organismos fototróficos, tais como as sulfobactérias verdes. Nesses ambientes, as sulfobactérias púrpuras crescem usando sulfeto proveniente da redução de sulfato e CO₂ (CAUMETTE *et al.*, 1997).

No presente estudo, nos TDH de 12h e 24h, tanto nos biofilmes dos reatores quanto na espuma do R2-24h, foi possível observar essa disposição das sulfobactérias púrpuras formando uma camada abaixo da camada verde conforme mostra a figura 6.21.

Figura 6.21 - Foto com detalhe da camada verde externa e camada interna púrpura (indicado pela seta) na espuma do R2-24h.



As bactérias do gênero *Chromatium* dependem de condições anaeróbias e são fototróficas obrigatórias, sendo que na fotossíntese anoxigênica, o sulfeto é oxidado parcialmente a enxofre ou completamente a sulfato. Os membros desse gênero são capazes de estocar grânulos de S⁰. O acúmulo de enxofre é uma vantagem competitiva dessas bactérias, sobre outras fotossintéticas anoxigênicas que depositam enxofre fora das células, devido ao fato do enxofre dentro da célula poder ser utilizado como doador de elétrons para fotossíntese anoxigênica, na ausência de sulfeto dissolvido. Além disso, o enxofre também pode ser usado como acceptor de elétrons para fermentação endógena de carboidratos estocados sob condições anóxicas, na ausência de luz (CAMACHO, 2009).

Em sistemas de tratamento de esgoto, as bactérias fototróficas púrpuras e verdes foram encontradas (SIEFERT *et al.*, 1978). O estudo utilizou amostra de lodo ativado e avaliou a distribuição de bactérias fototróficas na amostra, sendo que 51% a 75% corresponderam a

Rhodopseudomonas sphaeroides e *Rhodopseudomonas gelatinosa*, 6% a 25% foram *Rhodopseudomonas palustris* e *R.capsulata*, 1% a 5% foram de *Rhodospirillum tenue* e *Rhodopseudomonas viridis*. Enquanto que *Chromatium vinosum*, *Thiocapsa roseopersicina* e *Chlorobium limicola* foram presentes em menor proporção (<1%). Os resultados obtidos por Siefert *et al.* (1995) com relação a sulbactéria púrpura do gênero *Chromatium* foi similar ao obtido no presente estudo, no qual a bactéria foi encontrada em baixa abundância.

Thiobaca, outra sulfobactéria púrpura, pertencente a ordem *Chromatiales*, foi detectada somente no R2, com abundância relativa de 0,1% no TDH=24h e 0,4% no TDH=12h. Os membros do gênero *Thiobaca* têm morfologia de cocos, que podem aparecer isolados ou em pares, crescem com sulfeto como doador de elétrons e o enxofre é estocado transitoriamente dentro das células e posteriormente, oxidado a sulfato (REES *et al.*, 2002).

Outros sulfobactérias púrpuras pertencentes a ordem *Chromatiales* também foram presentes nos reatores, *Thiorhodococcus* foi abundante somente no biofilme do R1-12h com abundância relativa de 0,5%. Membros desse gênero possuem morfologia de cocos e crescem com sulfeto ou tiosulfato como doador de elétrons e o enxofre é estocado transitoriamente dentro das células (RABOLD *et al.*, 2006).

O gênero *Halochromatium*, também da ordem *Chromatiales*, apresentou abundância relativa de 0,2% somente na espuma do R2-24h. Membros desse gênero possuem crescimento fotolitoautotrófico, em condições anóxicas. Durante a oxidação do sulfeto, glóbulos de enxofre são formados no interior das células, sendo que o sulfato é o produto final da oxidação. Além disso, o hidrogênio também pode ser usado como doador de elétrons. Na presença de sulfeto e bicarbonato, substratos orgânicos podem ser fotoassimilados (KUMAR *et al.*, 2007).

Além dessas sulfobactérias púrpuras que apresentaram abundância relativa maior que 0,1%, outros gêneros em menor abundância foram identificados nos reatores. No R1-24h, os gêneros *Thiocapsa* e *Thiococcus* apresentaram abundância relativa de 0,02%. No R1-12h, *Thiococcus* também esteve presente com abundância relativa de 0,05%. No R2-24h, o gênero *Lamprocystis* apresentou abundância relativa de 0,04%.

Com relação as sulfobactérias verdes, o gênero *Chlorobium* foi presente somente no R1-12h com abundância relativa baixa de 0,05%. Enquanto que no resultado da análise de DGGE, a amostra do biofilme do R1-12h também mostrou a presença de *Chlorobium* com similaridade de 90%. Sulfobactérias verdes constituem um grupo taxonômico distinto das sulfobactérias púrpuras. As sulfobactérias verdes requerem condições anóxicas estritas e necessitam de um quarto da intensidade de luz que as sulfobactérias púrpuras, na ordem de atingir taxas de crescimento comparável, e também apresentam diferente absorção quando comparado com as sulfobactérias púrpuras (ALONSO *et al.*, 2005).

Apesar dos resultados de pirosequenciamento terem apresentado maior abundância de sulfobactérias púrpuras do que verdes, é possível que *Chlorobium* tenha permanecido no R1-12h devido uma interação sintrófica entre essa bactéria e as sulfobactérias fototróficas púrpuras. Segundo estudo realizado por Alonso (2005), com co-cultura de *Chlorobium* e *Chromatium*, a oxidação de sulfeto a enxofre elementar ocorreu por *Chlorobium* e subsequentemente a oxidação do enxofre a sulfato foi realizada por *Chromatium*.

Com relação as sulfobactérias incolores presente nos reatores, no biofilme do R1-12h, o gênero *Sulfuricurvum*, pertencente a ordem *Campylobacterales*, foi detectada somente nesse reator, com abundância relativa de 0,1%. O gênero *Sulfuricurvum* envolve bactérias anaeróbias facultativas, capazes de crescer sob condições microaeróbias ou anaeróbias, quimiolitotróficas, capazes de utilizar sulfeto e tiosulfato como doador de elétrons (KODAMA *et al.*, 2004).

O gênero *Thiomonas* também foi encontrado nos reatores em menor abundância relativa, (cerca de 0,02% no R1-24h e R2-12h). As bactérias do gênero *Thiomonas* são quimiolitotróficas facultativas, cujo crescimento ocorre na presença de sulfeto ou tiosulfato e o ácido sulfúrico pode ser formado (MOREIRA e MILS, 1997).

As sulfobactérias púrpuras, verdes e incolores utilizam principalmente sulfeto como doador de elétrons, mas em condições anaeróbias, algumas bactérias oxidadoras de sulfeto podem crescer na presença de tiosulfato, que atua como doador de elétrons, e com nitrato ou outros compostos nitrogenados como aceptores de elétrons, que são metabolizados a sulfato e nitrogênio, respectivamente (FRIEDRICH *et al.*, 2005).

No reator 2, foi encontrado o gênero *Dyella*, pertencente a ordem *Xanthomonadales*, com abundância relativa de 0,2% nos TDH de 12h e 24h. A espécie *Dyella thiooxydans* é uma bactéria facultativa quimiolitotrófica, capaz de oxidar tiosulfato e formar ácido sulfúrico, mas não utiliza sulfeto como doador de elétrons (ANANDHAM *et al.*, 2011).

Na ordem *Thermales*, o gênero *Meiothermus* foi presente somente no R1-12h com abundância relativa de 0,2%. A espécie *Meiothermus cerbereus*, representante desse gênero, cresce somente em meio de cultura suplementado com tiosulfato (ZHANG *et al.*, 2010).

A abundância relativa total de sulfobactérias púrpuras foi maior nos R1-24h e R1-12h do que nos R2-24h e R2-12h. Portanto, pode-se pressupor que a diminuição do TDH de 24 para 12h em ambos os reatores afetou a abundância relativa dessas bactérias. Com relação ao meio suporte, o anel plástico propiciou maior abundância de sulfobactérias púrpuras que a espuma e o biobob. Além disso, as bactérias oxidadoras de sulfeto púrpuras foram mais abundantes que as bactérias incolores nos reatores, isso pode ter ocorrido devido a uma competição entre as sulfobactérias pelo sulfeto.

Estudo realizado em biofilmes naturais revelou a ocorrência de competição pelo sulfeto entre sulfobactérias incolores e púrpuras. Neste estudo, as bactérias púrpuras foram capazes de se moverem pelo sedimento em condições de baixa intensidade de luz; esta característica as tornou mais eficientes no consumo do sulfeto acumulado na camada anóxica do sedimento do que as bactérias incolores (JORGENSEN e DES MARAIS, 1986).

Portanto, uma vez que as sulfobactérias foram abundantes nos reatores, especialmente as púrpuras, esses micro-organismos devem ter sido os responsáveis pelo consumo do sulfeto dissolvido nos reatores, já que a eficiência média de sulfeto no TDH de 24h foi de 30% no R1 e 65% no R2, enquanto que no TDH de 12h, a eficiência média de sulfeto foi de 90% em ambos os reatores.

As bactérias púrpuras não sulfurosas também foram presentes nas amostras dos reatores desse estudo, conforme figura 6.20. Essas bactérias podem ser fototróficas anaeróbicas, na presença de luz, ou aeróbicas quimiotróficas, na ausência de luz. A natureza facultativa dessas bactérias tem permitido sua ampla distribuição em rios, lagos, oceanos e no solo. Além disso, as

bactérias púrpuras não sulfurosas são comumente isoladas de sistemas de tratamento de águas residuárias (ZHANG *et al.*, 2003).

Dentre as bactérias púrpuras não sulfurosas encontradas nos reatores, *Rhodobacter*, pertencente a ordem *Rhodobacterales*, foi abundante somente no R2-12h com abundância relativa de 0,1%. Apesar de ser considerada não sulfurosa, essa bactéria é capaz de realizar a oxidação de sulfeto a enxofre, que é depositado fora das células.

Outras bactérias púrpuras não sulfurosas, tais como *Rhodopseudomonas* e *Blastochloris*, pertencentes a ordem *Rhizobiales*, também foram abundantes e possuem capacidade de oxidar o sulfeto, mas o produto final da oxidação é o sulfato (FRIGAARD & DAHI, 2009). O gênero *Blastochloris* foi mais abundante na espuma do R2-24h (1,0%), seguido pelo R1-24h (0,8%), R1-12h (0,3%) e R2-12h (0,2%) e *Rhodopseudomonas* também foi mais abundante no R2-24h (5,2%), seguido por R2-12h (1,3%), R1-12h (0,5%) e R1-24h (0,3%). Os resultados de DGGE também mostraram a presença de *Rhodopseudomonas* com 93% de similaridade no R1-12h e 99% de similaridade no R2-12h.

Especificamente nas bactérias do gênero *Rhodopseudomonas*, o metabolismo de sulfeto ocorre somente sob condições anaeróbias e é acoplada a redução de CO₂. Em cultura pura, *Rhodopseudomonas* é sensível ao sulfeto, mas essa sensibilidade não ocorre quando cresce juntamente com outros micro-organismos. Na natureza, *Rhodopseudomonas* é frequentemente encontrada abaixo da camada contendo micro-organismos fotossintéticos verdes, em uma camada estratificada onde as concentrações de sulfeto são menores (KOBAYASHI *et al.*, 1983).

Assim, é possível que a abundância de *Rhodopseudomonas* nos reatores tenha sido favorecida, uma vez que baixas concentrações de sulfeto (em média 2mg/L) ocorreram nos reatores nos TDH de 24h e 12h. Como discutido anteriormente e apresentado na figura 6.22, é possível que a formação de uma camada verde, contendo micro-organismos fotossintéticos tenha contribuído para o crescimento de bactérias púrpuras sulfurosas e não sulfurosas abaixo dessa camada.

Segundo Kobayashi *et al.* (1983) é provável que as bactérias púrpuras não sulfurosas metabolizem compostos orgânicos produzidos pelas bactérias fotossintéticas verdes oxidadoras de sulfeto e outras bactérias capazes de degradar macromoléculas complexas. Além disso, estudo realizado por Siefert *et al.* (1978) mostrou a presença do gênero *Rhodopseudomonas* no sistema de lodos ativados, no qual 51% a 75% das bactérias corresponderam a *Rhodopseudomonas sphaeroides* e *Rhodopseudomonas gelatinosa* e 6% a 25% foram *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodopseudomonas capsulata*.

Além de *Rhodopseudomonas* e *Rhodobacter*, como representantes de bactérias púrpuras não sulfurosas, membros do gênero *Roseospira*, pertencente a ordem *Rhodospirillales*, são capazes de crescimento fotoautotrófico com o sulfeto como doador de elétrons e também podem ter crescimento quimiorganotrófico sob condições micro-óxicas (GUYONEAUD *et al.*, 2002). Esse gênero foi presente somente no R1-12h com abundância relativa de 0,1%.

Rhodoplanes, outro gênero de bactéria púrpura não sulfurosa, pertencente a ordem *Rhizobiales*, foi encontrada na espuma do R2-24h com abundância relativa de 0,1%. As bactérias desse gênero foram isoladas de águas residuárias e lagos. São bactérias fototróficas facultativas com crescimento anaeróbico, na presença de luz, ou aeróbico, na ausência de luz e o crescimento fotoautotrófico ocorre com tiosulfato como doador de elétrons (HIRAISHI *et al.*, 1994)

Por outro lado, *Rhodocista*, também pertencente a ordem *Rhodospirillales*, foi detectada somente no R2, com abundância relativa de 0,7% no TDH de 24h e 0,2% no TDH de 12h, mas não foi encontrado relatos na literatura do uso de sulfeto ou tiosulfato por essa bactéria. Nos resultados de DGGE, *Rhodocista pekingensis* foi identificada com 98% de similaridade, mas foi encontrada somente no R1-24h.

Assim como *Rhodocyclus*, da ordem *Rhodocyclales*, que também é uma bactéria púrpura não sulfurosa, não há relatos na literatura da possibilidade de utilizar sulfeto ou tiosulfato como doador de elétrons (PFENNING, 1978)

Entretanto, é importante ressaltar que a presença de bactérias púrpuras não sulfurosas nos reatores deve estar relacionada a degradação de ácidos graxos voláteis de cadeia curta, uma

vez que trabalhos prévios verificaram o envolvimento de *Rhodobacter* e *Rhodospseudomonas* na degradação destes ácidos presentes em águas residuárias (OKUBO *et al.* 2006).

No que se refere as bactérias verdes não sulfurosas, estas foram detectadas nos reatores mas somente no TDH de 12h. O gênero *Chloroflexus*, pertencente a ordem *Chloroflexales*, foi abundante no R1-12h (0,2%) e o gênero *Deinococcus*, pertencente a ordem *Deinococcales*, foi abundante no R2-12h (0,6%).

Os membros do gênero *Chloroflexus* são capazes de oxidar compostos reduzidos de enxofre durante o crescimento fototrófico. *Chloroflexus aurantiacus* pode apresentar crescimento fotoautotrófico com hidrogênio ou sulfeto como doador de elétrons. Quando o sulfeto é oxidado por *Chloroflexus*, o S⁰ é depositado fora das células (FRIGAARD *et al.*, 2009).

Com relação ao gênero *Deinococcus*, não foi reportada na literatura a possibilidade desse micro-organismo utilizar o sulfeto como doador de elétrons, mas essa bactéria tem sido conhecida por ter alta resistência à desidratação e radiação ultra-violeta (MADIGAN *et al.*, 2010).

As bactérias não sulfurosas púrpuras e verdes estiveram presentes nos reatores, com maior abundância na espuma do R2-24h, seguido pelos biofilmes do R2-12h, R1-12h e R1-24h. Especificamente no R2, a mudança de TDH de 24h para 12h diminuiu a abundância das bactérias não sulfurosas no reator, enquanto que no R1, houve um ligeiro aumento da abundância dessas bactérias quando houve mudança do TDH de 24h para 12h.

No que se refere a influência do meio suporte, no TDH de 24h foi possível observar que o R2-24h, sem meio suporte, permitiu maior abundância das bactérias não sulfurosas do que nos reatores R1-24h, R1-12h e R2-12h, com meio suporte. Portanto, tanto a espuma que cresceu como uma camada espessa, quanto o maior tempo de detenção hidráulica no reator, tenham sido os fatores que favoreceram o crescimento das bactérias não sulfurosas púrpuras e verdes no R2-24h .

Os reatores apresentaram alta diversidade de bactérias envolvidas na oxidação de sulfeto. Alguns estudos apresentam que maior biodiversidade no sistema aumenta a estabilidade

ecológica, o que torna um fator de resistência as condições de stress (TILMAN *et al.*, 2006; WRIGHTON *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2014).

O uso de meio suporte também é um fator que permite maior estabilidade da biomassa, imobilizada no biofilme, com relação as mudanças ambientais que podem ocorrer no sistema. Além disso, o biofilme pode permitir maior diversidade metabólica e taxonômica quando comparado com sistemas que operam com biomassa dispersa, pois tais sistemas podem ficar sujeitos a lavagem da biomassa e provocar a seleção de um número reduzido de micro-organismos (FERRERA *et al.*, 2004). Além disso, a presença do material suporte cria condições para a formação de micro nichos distintos, com gradientes de concentração de substrato e nutrientes diferentes, favorecendo maior diversidade de micro-organismos.

6.2.7 Gêneros de bactérias redutoras de sulfato

Com relação a presença de bactérias redutoras de sulfato nos reatores, apresentaram baixa abundância relativa nos reatores. Dentre as bactérias redutoras de sulfato que estiveram presentes nos reatores, o gênero *Desulforhabdus* apresentou 0,2% de abundância relativa no biofilme do R1-24h e 0,1% no R1-12h, enquanto que *Desulfomonile* foi presente somente no biofilme do R1-24h (0,2%).

Bactérias do gênero *Desulforhabdus* já foram isoladas de reatores UASB alimentados com acetato. Enquanto que bactérias do gênero *Desulfomonile* são gram-negativas, anaeróbias estritas que são capazes de reduzir sulfato e tiosulfato a H₂S, sendo que espécies desse gênero foram encontradas tanto em sedimentos marinhos quanto em lodo de reatores anaeróbios. (BRENNER *et al.*, 2005a)

Além disso, no biofilme do R1-12h, o gênero *Desulfonema*, pertencente a ordem *Desulfobacterales*, também foi presente somente nessa amostra, com abundância relativa de 0,1%. O gênero *Desulfovibrio*, pertencente a ordem *Desulfovibrionales*, apresentou maior abundância no biofilme dos reatores R1-12h (0,6%), seguido por R1-24h e R2-24h, com abundância relativa de 0,2%.

Segundo Janssen *et al.* (2009), ambientes com limitação de sulfato pode ocasionar uma competição entre BRS, mas pouco se conhece sobre o aspecto dessa competição.

Desulfovibrio utiliza hidrogênio e tem maior afinidade pelo sulfato, quando comparada com outra BRS do gênero *Desulfobulbus*, que degrada propionato.

Desulfovibrio foi o gênero com maior abundância no biofilme do R1-12h, seguido pelo biofilme do R1-24h e escuma R2-24h. A maior abundância de BRS foi no R1 e a mudança do TDH de 24h para 12h aumentou a abundância das BRS no reator, enquanto que no R2, a diminuição do TDH de 24h para 12h afetou a abundância de BRS, uma vez que no TDH de 12h essas bactérias não foram abundantes.

Com relação a influência do meio suporte, observou-se que o anel plástico no R1 permitiu maior abundância de BRS. Por outro lado, no biobob do R2-12h essas bactérias foram pouco abundantes (0,04% de *Desulfovibrio*), quando comparado com o R2-24h, no qual o crescimento desses micro-organismos teria ocorrido de forma dispersa. Portanto, o anel plástico propiciou maior abundância de BRS, quando comparado com o biobob.

Com base nos resultados das análises de sulfato, a baixa abundância de bactérias redutoras de sulfato nos reatores pode estar associada ao fato de não ter ocorrido consumo de sulfato nos reatores, segundo os valores medianos de sulfato afluente e efluente que foram similares entre os reatores no TDH de 24h (afluente: 17mg/L; R1: 21mg/L; R2: 24mg/L) no TDH de 12h (afluente: 7 mg/L; R1 e R2: 9mg/L).

6.2.8 Resumo dos resultados obtidos e possíveis metabolismos encontrados nos reatores

A tabela 6.9 resume alguns dos principais resultados obtidos e apresenta de forma comparativa os dados para os dois reatores, nas diferentes fases operacionais. Com base na tabela 6.9 pode-se verificar que a melhor condição obtida para a oxidação de sulfeto foi para o reator 1 (com anel plástico) e TDH de 12 horas. Nesta condição maior massa de enxofre elementar foi acumulada quando comparada com o outro reator (contendo Biobob).

Não obstante, considerando o objetivo de recuperar enxofre elementar (acumulado na biomassa) a melhor condição seria reator 1 (com anel plástico) e TDH de 6 horas, que apresentou tanto boa eficiência de oxidação de sulfeto, quanto elevada quantidade de enxofre elementar acumulado.

No que se refere a composição da comunidade microbiana, verificou-se que a comunidade desenvolvida no reator 1 (anel plástico) no TDH de 24 horas foi semelhante a comunidade microbiana presente em um reator UASB (metanogênico) tratando esgoto doméstico, indicando que nesta condição a comunidade poderia estar desempenhando os processos de degradação anaeróbia da matéria orgânica (fermentação, acidogênese, acetogênese, e metanogênese), além da oxidação de sulfeto (cuja eficiência foi baixa nesta condição).

Porém, quando o TDH foi reduzido para 12 horas, esta condição favoreceu a oxidação biológica do sulfeto, e isso pode ser evidenciado pelo aumento na eficiência de oxidação de sulfeto, e diminuição dos grupos microbianos capazes de realizar a degradação de compostos orgânicos (*Synergistetes* e *Euryarchaeota*). Mas como nessa mesma fase, o acúmulo de enxofre elementar foi menor que na fase 1 (TDH de 24h), significa que o sulfeto foi oxidado e o produto final foi enxofre elementar, uma vez que a conversão a sulfato não foi observada, com base nos resultados físico-químicos.

Tabela 6.9 - Principais resultados obtidos dos reatores R1 e R2, nos TDH de 24h, 12h e 6h.

Resultados	Reator 1			Reator 2		
	TDH 24h (anel plástico)	TDH 12h (anel plástico)	TDH 6h (anel plástico)	TDH 24h (sem meio suporte)	TDH12h (Biobob)	TDH 6h (Biobob)
Eficiência de remoção de sulfeto (%)	30	90	52	65	90	69
Massa total de S ^o acumulada (mg)	3536,0	706,0	3130,5	37,2	304,6	1026,0
Total de bactérias sulfurosas (%)*	1,6	2,0	NR	1,0	0,9	NR
Índice diversidade Shannon **	3,8	4,22	NR	3,57	3,92	NR
Abundância relativa de <i>Synergistetes</i> (%)	45,4	29,2	NR	31,3	28,8	NR
Abundância relativa de <i>Proteobacteria</i> (%)	6,9	20,4	NR	33,6	30,8	NR
Abundância relativa de <i>Firmicutes</i> (%)	8,5	11,8	NR	11,9	10,8	NR
Abundância relativa de <i>Euryarchaeota</i> (metanogênicas)	17,9	2,9	NR	0,9	2,5	NR
Abundância relativa de <i>Verrucomicrobia</i> (%)	3,6	2,8	NR	3,8	11,6	NR
Total de bactérias desnitrificantes (%)	0,8	0,4	NR	13,3	14,9	NR

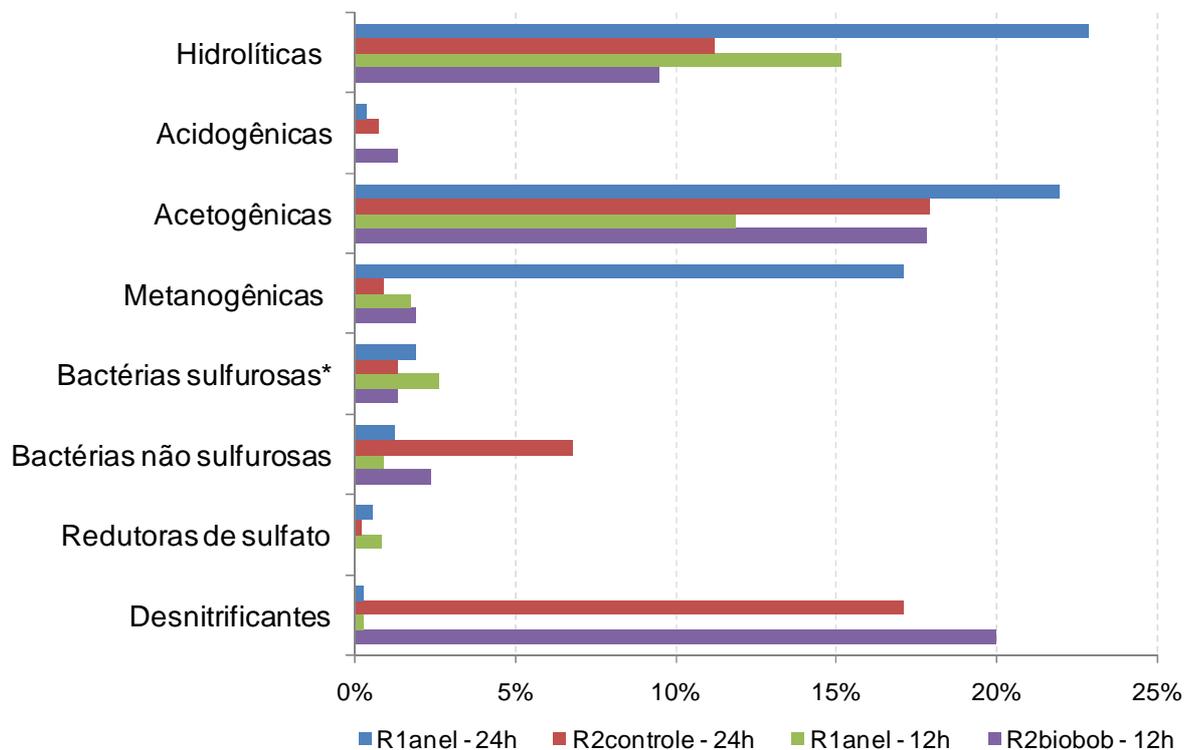
*abundancia relativa dos gêneros de bactérias sulfurosas detectadas pelo pirosequenciamento -454

**Índice de diversidade de Shannon calculado a partir das sequencias obtidas pelo pirosequenciamento-454

NR: não realizado

Com base nos gêneros mais abundantes encontrados nos reatores, elaborou-se o gráfico da figura 6.22 que associa os gêneros encontrados nos reatores com suas possíveis funções metabólicas. A figura 6.22 mostra a somatória dos gêneros em função dos possíveis metabolismos (inferidos considerando a classificação filogenética das OTU's encontradas) que os micro-organismos podem ter realizado nos reatores, com e sem material suporte, e nos TDHs distintos. O apêndice B mostra a abundância relativa dos gêneros utilizados para elaboração do gráfico da figura 6.22, com suas respectivas funções metabólicas.

Figura 6.22 - Somatória dos gêneros presentes nos reatores em função dos possíveis metabolismos que podem ter sido realizados nos reatores.



* No grupo de bactérias sulfurosas foi considerada na somatória dos gêneros, a abundância relativa da ordem *Chromatiales*.

Conforme mostra a figura 6.22, considerando as possíveis funções metabólicas desenvolvidas pelos micro-organismos, os gêneros envolvidos na hidrólise, acetogênese e metanogênese foram mais abundantes no biofilme do R1-24h, seguido pelo R2-24h, com exceção das metanogênicas que foram menos abundantes nesse reator.

Por outro lado o R2-24h foi a condição que propiciou maior abundância de bactérias não sulfurosas e favoreceu o desenvolvimento de desnitrificantes, sendo que as últimas foram mais abundantes no R2-12h. Com relação as bactérias sulfurosas, foi possível observar a

presença das mesmas nos reatores nas duas fases operacionais, sendo que maior abundância foi observada no R1-12h. No que se refere as bactérias redutoras de sulfato, é notável que esse grupo foi o menos abundante nos reatores.

Apesar dos gêneros terem sido agrupados e somada a abundância relativa dos mesmos, de acordo com a função metabólica que poderiam exercer nos reatores, ressalta-se que a versatilidade metabólica dos mesmos é um importante fator que pode influenciar na proposta de distribuição dos grupos apresentado na figura 6.22.

7 CONCLUSÕES

A configuração dos reatores similar ao decantador de reator UASB favoreceu o desenvolvimento de uma comunidade microbiana extremamente diversificada em ambos os reatores, que foi capaz de promover a oxidação biológica de sulfeto. Sulfobactérias púrpuras e verdes foram detectadas tanto pelo DGGE quanto pela técnica de pirosequenciamento-454, apresentando abundância relativa de 1,0 a 2,0%. Bactérias com morfologias semelhantes a *Chromatium* foram predominantes nas observações microscópicas.

Com base nos resultados de pirosequenciamento o R1 (com anel plástico) operado nos TDHs de 24 e 12h apresentou maior abundância relativa de bactérias sulfurosas quando comparado com o R2. Este reator por sua vez, na condição sem meio suporte e no TDH de 12h, apresentou maior abundancia de bactérias não-sulfurosas. Portanto, o meio suporte anel plástico propiciou maior desenvolvimento de bactérias sulfurosas, quando comparado com o reator sem meio suporte e com biobob como meio suporte.

A análise comparativa dos resultados das eficiências de remoção de sulfeto e produção de enxofre elementar entre os dois reatores, operados nos três diferentes TDHs, apontaram que maior eficiencia de oxidação de sulfeto foi observada, em torno de 90%, quando ambos os reatores foram operados no TDH de 12 horas, porém maior acúmulo de S⁰ na biomassa e no lodo foi verificado no R1 (com anel plástico) com TDH de 24h.

A composição da comunidade microbiana desenvolvida em cada reator foi diferente, com índices de similaridade baixos em torno de 55%, indicando que meio suportes diferentes

permitiram a formação de comunidades microbianas distintas. Entretanto, a composição da comunidade microbiana foi similar dentro de um mesmo reator e nessa condição, não houve influência do TDH e da presença ou ausência do material suporte. Especificamente no R2, a presença do biobob demonstrou pouca influência na composição da comunidade microbiana.

A redução do TDH de 24h para 12h influenciou na abundância relativa dos filos mais abundantes, sendo que o filo *Synergistetes* abundante no R1, bem como o filo *Proteobacteria* com maior abundância no R2, apresentaram valores de abundância relativa menor no TDH de 12h. Especificamente, o filo *Euryarchaeota* (metanogênicas) apresentou expressiva redução no R1 quando houve diminuição do TDH de 24h para 12h.

A melhor condição operacional para promover a recuperação de enxofre elementar foi observada no R1 no TDH de 24h, com anéis plásticos como meio suporte, no qual 3,5g de massa de S⁰ foi produzida nesse reator, considerando a massa de S⁰ tanto do biofilme quanto do lodo.

8 RECOMENDAÇÕES

Realizar o monitoramento dos parâmetros DQO, nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato, durante o processo de oxidação biológica de sulfeto nos reatores, a fim de verificar a remoção da matéria orgânica remanescente do tratamento do reator UASB, bem como verificar se o processo de oxidação de sulfeto estaria acoplado ao processo de desnitrificação.

Avaliar a alternativa de configurar o decantador do reator UASB para introduzir o material suporte, a fim de permitir maior retenção da biomassa e melhores eficiências na remoção do sulfeto dissolvido no efluente do reator.

Recuperar enxofre elementar intercalando etapas de remoção de sulfeto e recuperação de enxofre do lodo, sendo que para esta última etapa, desenvolver metodologia que também permita a recuperação de enxofre do biofilme de reatores.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBATI, C.; SILVA E.L. Remoção de sulfetos em efluentes líquidos por bactérias fotossintéticas em biorreator convencional. COBEQ, p.1-6, 2008.
- ACHENBACH, L. A.; CAREY, J.; MADIGAN, M. T. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection anoxygenic phototrophs in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.7, p.2922-2926, 2001.
- ALONSO, M.M.; BLEIJSWIJK, J.V.; GAJU, N.; MUYZER, G. Diversity of anoxygenic phototrophic sulfur bacteria in the microbial mats of the Ebro Delta: a combined morphological and molecular approach. *FEMS Microbiology Ecology*, v.52, p.339-350, 2005.
- AMIM, R. S. Avaliação de parâmetros cinéticos de uma cultura mista de micr-organismos destinados à eliminação autotrófica de nitrogênio via oxidação de tiosulfato. Dissertação de Mestrado – *Escola de Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina.*, p. 161, 2008.
- ANANDHAM, R.; KWON, S.; GANDHI, P.I.; KIM, S.; WEON, H.; KIM, Y.; SA, T.; KIM, Y-K.; JEE, H-J. *Dyella thiooxydans* sp. nov., a facultatively chemolithotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from rhizosphere soil of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p.392–398, 2011.
- APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, 2012.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. *Ecologia microbiana e microbiologia ambiental*. 3º Edição. Madri: Pearson Education S.A., 2002.
- BAENA, S.; FARDEAU, M.L.; LABAT, M.; OLLIVIER, B.; THOMAS, P.; GARCIA, J.L.; PATEL, B.K. *Aminobacterium colombiense* gen. nov. sp. nov., an amino acid-degrading anaerobe isolated from anaerobic sludge. *Anaerobe*, v.4, n.5, p. 241-250, 1998.
- BERISTAIN-CARDOSO, R.B., SIERRA-ALVAREZ, R., ROWLETTE, P., FLORES, E.R., GÃMEZ, J. & FIELD, J.A. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 1148-1157, 2006.
- BILAK, J.E.; ROUDIE`RE, 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, 1028–1035, 2009.
- BISWAS, B.; GRESSHOFF, P.M. The Role of Symbiotic Nitrogen Fixation in Sustainable Production of Biofuels. *Int. J. Mol. Sci.* v. 15, p.7380-7397, 2014.
- BITTON, G. *Wastewater Microbiology*. 3 ed. John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. *Bergey’s manual of systematic bacteriology*. Vol. Two. The Proteobacteria – Part B: Gammaproteobacteria, second ed. *Springer*, USA, 2005a.
- BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J. T. *Bergey’s manual of systematic bacteriology*. Vol. Two. The Proteobacteria – Part C: The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria, second ed. *Springer*, Estados Unidos, 2005b.
- BRIÉE, C.; MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P. Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology*, v. 58; p. 213-227, 2007.
- BRYANT, J.P. PROVENZA, F.D.; PASTOR, J.; REICHARDT, P.B.; CLAUSEN, T.P.; TOIT, J. Interactions between woody plants and browsing mammals mediated by secondary metabolites. *Rev. Ecol.* v.22, p.431-446, 1991.
- BROCHIER-ARMANET, C. BOUSSAU, B.; GRIBALDO, S.; FORTERRE, P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota, *Nature Reviews Microbiology*, v.6, p.245-252, 2008.
- BROWKER, R.P.G.; SMITH, J.M.; WEBSTER, N. A. *Odor e corrosion control in sanitary sewage and treatment plants*. New York: *Hemisphere Publishing Corp*, 1989.
- BUISMAN, C. J. N.; WIT, B.; LETTINGA, G. Biotechnological sulphide removal in three polyurethane carrier reactors: stirred reator, biorotor reactor and upflow reactor. *Water Research*, v.24, n.2, p.245-251, 1990.

- BUISMAN, C. LETTINGA, G., PAASSCHENS, C. W. M.; HABETS, L.H.A. Biotechnological sulphide removal from effluents. *Water Science and Technology*, v. 24, p.347-356, 1991.
- CAPORASO, J. G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; KNIGHT, R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, v. 26, n. 2, January 15, 2010, p. 266-267, 2010.
- CAUMETTE, P.; IMHOFF, J. F.; SÜLING, J.; MATHERON, R. *Chromatium glycolicum* sp. nov., a moderately halophilic purple sulfur bacterium that uses glycolate as substrate. *Arch Microbiol*, v.167, p.11-18, 1997.
- CHEN, X.; KONG,L.; WANG,X.; TIAN, S.; XIONG,Y. Accelerated start-up of moving bed biofilm reactor by using a novel suspended carrier with porous surface. *Bioprocess Biosyst Eng*, v.2, p.1-13, 1992.
- CHENG, W.; CHEN, H.; YAN, S.; SU, J. Illumina sequencing-based analyses of bacterial communities during short-chain fatty-acid production from food waste and sewage sludge fermentation at different pH values. *World J Microbiol Biotechnol.*, v. 30, p.2387-2395, 2014.
- CHERNICHARO, C.A.L. Princípio do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores anaeróbios. Departamento de engenharia sanitária e ambiental – DESA/UFMG, Belo Horizonte, v.5, 2ª edição, 2007. 380 p.
- CHOU,J.H.; JIANG,S.R.; CHO, J.C.; SONG, J.; LIN, M.C.; CHEN, W.M. *Azonexus hydrophilus* sp. nov., a nifH gene-harboring bacterium isolated from Freshwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 58, p. 946–951, 2008.
- CHRISTENSEN, P.; COOK, F.D. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v. 28 , pp. 367–393, 1978.
- EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, August 12, 2010, 2010.
- EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H.; ZEHNDER, A. J. B.; WAGNER, M.; MEER, J.R.V.D. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.6, p. 3213-3222, 2003.
- ELSHAHEED, M. S.; SENKO, J. M.; NAJAR, F. Z.; KENTON, S. M.; ROE, B. A.; DEWERS, T. A.; SPEAR, J. R.; KRUMHOLZ, L. R. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, n.9, p. 5609-5621, 2003.
- FAJARDO, C.; CORRAL-MOSQUERA, A.;CAMPOS, J.L.;MÉNDEZ,R. Autotrophic denitrification with sulphide in a sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Management*, v.113, p.552-556, 2012.
- FERNÁNDEZ, N.; DÍAZ, E.E.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Analysis of Microbial Community during Biofilm Development in an Anaerobic Wastewater Treatment Reactor. *Microb Ecol*, v. 56, p.121–132, 2008.
- FERRERA, I.; SÁNCHEZ, O.; MAS, J. A new non-aerated illuminated packed-column reactor for the development of sulfide-oxidizing biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.64, p.659-664, 2004.
- FERRIS, M. J.; 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.40-346, 1997.
- FRIEDRICH, C. G. Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, v.39, p.235-289, 1998.
- FRIEDRICH, C. G.; BARDISCHEWSKY, F.; ROTHER, D.; QUENTMEIER, A.; FISCHER, J. Prokaryotic sulfur oxidation. *Science*, v.8, p.253-259, 2005.
- FRIGAARD, N. DAHI, C. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, v.54, p.103-200, 2009.
- FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews*, v. 9, p. 403-413, 2011.
- FURUHATA, K.; MIYAMOTO, H.; GOTO, K.; KATO,Y.; HARA, M.;FUKUYAMA, M. *Roseomonas stagni* sp. Nov.,isolated from pond water in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v.54, p.167-171, 2008.
- GARCIA, G.P.P.; SOUZA,C.L.; GLORIA, R.M.; SILVA, S.Q.; CHERNICHARO, C.A.L. Biological oxidation of sulphides by microorganisms present in the scum layer of UASB reactors treating domestic wastewater. *Water Science and Technology*, v.66.9, p.1871-1878, 2012.

- GENTIL, VICENTE. Corrosão. 3. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. 1996
- GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 733-739, 2005. *Microbiology*, v. 3, p. 733-739, 2005.
- GOMES, A. S. Análise de dados ecológicos. Niterói: Universidade Federal Fluminense. 2004, 30 p.
- GONZALEZ-SANCHEZ, 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.
- GUYONEAUD, R.; MOUNÉ, S.; EATOCK, C. BOTHOREL, V.; REA, A.H.; WILLISON, J.; DURAN, R.; LIESACK, W.; HERBERT, R.; MATHERON, R.; CAUMETTE, P. Characterization of three spiral-shaped purple nonsulfur bacteria isolated from coastal lagoon sediments, saline sulfur springs, and microbial mats: emended description of the genus *Roseospira* and description of *Roseospira marina* sp. nov., *Roseospira navarrensis* sp. nov., and *Roseospira thiosulfatophila* sp. nov. *Arch Microbiol*, v.178, p.315-324, 2002.
- HAO, O. J.; CHEN, J.M.; HUANG, L.; BUGLASS, R.L. Sulfate-reducing bacteria. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v.26, p.155-187, 1996.
- HEISING, S., RICHTER, L., LUDWIG, W.; SCHINK, B. *Chlorobium ferrooxidans* sp. nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in coculture with a "Geospirillum" sp. strain. *Arch Microbiol*, v. 172, p.116-124, 1999.
- HENSAHAW, P.; MEDLAR, D.; MCEWEN, J. Selection of a support medium for a fixed-film green sulphur bacteria reactor. *Water Res.*, v.33, n.14, p.3107-3110, 1999.
- HENSHAW, P.F.; BEWTRA, J.K.; BISWAS, N. Hydrogen sulphide conversion to elemental sulphur in a suspended-growth continuous stirred tank reactor using *Chlorobium limicola*. *Water Res.*, v.32, n.6, p.1769-1778, 1998.
- HIRAIISHI, A.; UEDA, Y. Rhodoplanes gen. nov., a new genus of phototrophic including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes Bacteria roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.44, n.4, p. 665-673, 1994.
- HIRASAWA, J.S. SARTI, A.; AGUILA, N.K.S.D.; VARESCHE, M.B.A. Application of molecular techniques to evaluate the methanogenic archaea and anaerobic bacteria in the presence of oxygen with different COD:Sulfate ratios in a UASB reactor. *Anaerobe*, v.14, p. 209-218, 2008.
- HOLMER, M e STORKHOLM, P. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments. *Freshwater biology*, v.46, p.431-451, 2001.
- HOLT, JOHN G. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9 edition. Baltimore: Williams & Williams, 1994.
- HU, M.; WANG, X., WEN, X., XIA, Y. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, v.117, p.72-79, 2012.
- HULSHOFF POL, L. W.; LENS, P.N.L.; STAMS, A. J. M.; LETTINGA, G. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation*, v.9, p.213-224, 1998.
- JANSSEN, A.J.H.; SLEYSER, R.; VAN DER KAA, C.; JOCHEMSEN, A.; BONTSEMA, J.; LETTINGA, G. Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 47:327-333, 1995.
- JANSSEN, A.J.H.; MA, S.C.; LENS, P.; LETTINGA, G. Performance of a sulfide oxidizing expanded bed reactor supplied with dissolved oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*, v.53, p.32-40, 1997.
- JANSSEN, A.J.H.; MA, S.C.; LENS, P.; LETTINGA, G. Performance of a sulfide-oxidizing expanded-bed reactor supplied with dissolved oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*. 53:32-40, 1997.
- JANSSEN, A. J. H.; MEIJER, S.; BONTSEMA, J.; LETTINGA, G. Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60, n. 2, p. 147-155, 1998.
- JANSSEN, A.J.H.; LETTINGA, G.; DE KEIZER, A. Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur. Colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles. *Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects*. 151: 389-397, 1999.

- JANSSEN, A.J.H.; LENS, P.N.L, STAMS, A.J.K.; PLUGGE, C.M.; SOROKIN, D.Y.; MUYZER, G.; DIJKMAN, H.; ZESSEN, E.V.; LUIMES, P.; BUISMAN, C.J.N. Application of bacteria involved in the biological sulfur cycle for paper mill effluent purification. *Science*, v.407, p.1333-1343, 2009.
- JENSEN, A. B.; WEBB, C. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. *Process Biochemistry*, v. 30, n. 3, p. 225-236, 1995.
- JORGENSEN, B. B. e DES MARAIS, D. J. Competition for sulfide among colorless and purple sulfur bacteria in cyanobacterial mats. *FEMS Microbiology Reviews*, v.38, p.179-186, 1986.
- KADLEC, R.H.; KNIGHT, R.L. Treatment wetlands, Lewis Publication, Boca Raton, 2009, p.893.
- KAMP, A.; STIEF, P.; VOGT, H.N.S. Anaerobic sulfide oxidation with nitrate by a freshwater *Beggiatoa* enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.7, p.4755-4760, 2006.
- KLEINJAN, W. E.; DE KEIZER, A.; JANSSEN, A. J. H. Biologically produced sulfur. *Elemental Sulfur and Sulfur-Rich Compounds I*, v. 230, p. 167-187, 2003.
- KLOK, J.B.M.; VAN DEN BOSCH, P.L.F.; BUISMAN, C. J.; STAMS, A.J.M.; KEESMAN, K.J.; JANSSEN, A.J.H. Pathways of sulfide oxidation by haloalkaliphilic bacteria in limited-oxygen gas lift bioreactors. *Environmental Science and Technology*, v.46, p.7581-7586, 2012.
- KLOK, J.B.M.; GRAAFF, M.; VAN DEN BOSCH, P.L.F.; BOELEEE, N.C.; KEESMAN, K.J.; JANSSEN, A. J. H. A physiologically based kinetic model for bacterial sulfide oxidation. *Water Research*, v.47, p. 483-492, 2013.
- KOBAYASHI, H. A.; STENSTROM, M.; MAH, R.A. Use of photosynthetic bacteria for hydrogen sulfide removal from anaerobic waste treatment effluent. *Water Research*, v. 17, n.5, p.579-587, 1983.
- KODAMA, Y.; WATANABE, K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, p.2297-2300, 2004.
- KOYDON, S. Contribution of sulfate-reducing bacteria in soil to degradation and retention of COD and sulfate. Doctor Ingenieur. Zur Erlangung des akademischen Grades eines von der Fakultät für Bauingenieur-, Geo- und Umweltwissenschaften der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH). Karlsruhe, 2004.
- KRAGELUND, C.; THOMSEN, T. R.; MIELCZAREK, A. T.; NIELSEN, P. H. Eikelboom's morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum Chloroflexi. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 76, p. 451-462, 2011.
- KRISHNAKUMAR, B.; MAJUMDAR, S.; V.B. MANILAL, V.B.; AJIT HARIDAS. Treatment of sulphide containing wastewater with sulphur recovery in a novel reverse fluidized loop reactor (RFLR). *Water Research*, v. 39, p. 639-647, 2005.
- KRISHNA, N. D.; PHILIP, L. *Thiobacillus denitrificans* immobilized biotrickling filter for NO₂ removal. *Clean Techn. Environ. Policy*, v. 7, 285-293, 2005.
- KUMAR, P. A.; SRINIVAS, T. N. R.; SASIKALA, C.; RAMANA, C.V. *Halochromatium roseum* sp. nov., a non-motile phototrophic gammaproteobacterium with gas vesicles, and emended description of the genus *Halochromatium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 2110-2113, 2007.
- KUENEN, J.G., Colourless sulphur bacteria and their role in the sulphur cycle. *Plant and soil*, v.43 (1), p. 49-76, 1975.
- KUENEN, J.G., ROBERTISON, L.A. The use of natural bacterial populations for the treatment of sulfur containing wastewater. *Biodegradation*, v.3, p. 239-254, 1992.
- LAUREN, N.R.; WATKINSON, J.H. Elemental sulphur analysis using high-performance liquid chromatography on 10-µm rigid polymer particles. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 348, p. 317-320, 1985.
- LEDUC, L. G.; FERONI, G.D. The chemotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews*, v.14, p.103-120, 1994.
- LENS P. N. L., VISSER A., JANSEN A. J. H., HULSHOFF POL L. W. AND LETTINGA G. Biotechnological treatment of organic sulphate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 28: pp. 41-88, 1998.

- LENS, P. N. L.; KUENEN, J. G. The biological sulfur cycle: Novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology*, v. 14(8), p. 57-66, 2001.
- LOHWACHARIN, J.; ANNACHHATRE, A. P. Biological sulfide oxidation in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 7, p. 2114-2120, 2010.
- LOPES, M.V. Descrição da microbiota relacionada às transformações do enxofre em sedimentos de manguezais. São Paulo, 2013, 100p. Tese apresentada a Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- LUO, Y.H. e MITSUI, A. Sulfide as electron source for H₂-photoproduction in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain Miami BG 043511, under stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v.35, p.203-207, 1996.
- MA, J.; WANG, Z.; YANG, Y.; MEI, X.; WU, Z. Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454 high-throughput pyrosequencing. *Water Research*, v. 47, p. 859-869, 2013.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de brock. *Prentice-Hall, 3ª Edition*, 2010.
- MAHMOOD, Q., ZHENG, P., HU, B., JILANI, G., AZIM, M.R., WU, D. & LIU, D. Isolation and characterization of *Pseudomonas stutzeri* QZ1 from an anoxic sulfide-oxidizing bioreactor. *Anaerobe*, 15, 108-115, 2009.
- MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M. e SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.15, p.593-600, 1992.
- MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M. C.; SWINGS, J. *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly(ϵ -caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1961-1966, 2003.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA 430/11. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res43011.pdf>. Acesso em: 10/07/13.
- MISSAGIA, B. S. Estudo das comunidades bacterianas em filtros biológicos percoladores utilizados para o pós-tratamento de efluentes de um reator UASB (Tese de Doutorado) Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- MOREIRA, D. MILS, R. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and Other Mixotrophic Thiobacilli: Proposal for *Thiomonas* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.47, n.2, p. 522-528, 1997.
- MORTARI, A. LORENZELLI, L. Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, v.60, p.8-21, 2014.
- MUYZER, G.; STAMS, A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature*, v.6, p.441-454, 2008.
- NETO, P. P. G. Caracterização dos micro-organismos oxidadores de sulfeto e metano em reator UASB. 75f. Dissertação de Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- OKABE, S.; MATSUDA, T.; SATOH, H.; ITOH, T.; WATANABE, Y. Sulfate reduction and sulfide oxidation in aerobic mixed population biofilms. *Water Science and Technology*, v.37, n.4-5, p.131-138, 1998.
- OKUBO, Y.; FUTAMATA, H.; HIRAISHI, A. Characterization of phototrophic purple nonsulfur bacteria forming colored microbial mats in a swine wastewater ditch. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.9, p.6225-6233, 2006.
- OVERMANN, J.; FISCHER, U.; PFENNIG, N. A new purple sulfur bacterium from saline littoral sediments, *Thiorhodovibrio winogradskyi* gen. nov. and sp. nov. *Arch Microbiol*, v.157, p.329-335, 1992.
- OUDE EFERINK, S. J. W. H.; VISSER, A.; HULSHOFF POL, L. W.; STAMS A. J. M. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbial Reviews*., v.15, p.119-136, 1994.
- PAGELLA, C.; FAVERI, D.M. H₂S gas treatment by iron bioprocess. *Chem. Eng. Sci*, v.55, p.2185-2194, 2000.
- PARSHINA, S.N.; KLEEREBEZEM, R.; SANZ, J.L.; LETTINGA, G.; NOZHEVNIKOVA, A.N.; KOSTRIKINA, A.N.; LYSENKO, A.M.; STAMS, J.M. *Soehngenia saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and

- Clostridium amygdalinum* sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1791–1799, 2003.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic, San Diego, CA., 1989.
- PEPE, O.; VENTORINO, V.; BLAIOTTA, G. Dynamic of functional microbial groups during mesophilic composting of agro-industrial wastes and free-living (N₂)-fixing bacteria application. *Waste Management*, v. 33, p.1616–1625, 2013.
- PFENNIG, N. *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a Ring-Shaped, Vitamin B₁₂-Requiring Member of the Family Rhodospirillaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.28, n.2, p. 283-288, 1978.
- PLAS, C.; WIMMER, K.; HOLUBAR, P.; MATTANOVICH, D.; DANNER, H.; JELINEK, E.; HARANT, H.; BRAUN, R. Degradation of carbondisulphide by a Thiobacillus isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.38, p. 820-823, 1993.
- PÉREZ, H. e VILLA, P. Desulfuración biológica: Uma alternativa para el tratamiento de emisiones de gases a la atmosfera. *AIDIS*, v.5, n.3, p.22-27, 2004.
- RABOLD, S.; GORLENKO, V. M.; IMHOFF, J.F. *Thiorhodococcus mannitoliphagus* sp. nov., a purple sulfur bacterium from the White Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p.1945–1951, 2006.
- REES, G.N.; HARFOOT, C.G.; JANSSEN, P.H.; SCHOENBORN, L.; KUEVER, J.; LÜNSDORF, H. *Thiobaca trueperi* gen. nov., sp. nov., a phototrophic purple sulfur bacterium isolated from freshwater lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 671-678.
- REZENDE, J.C.; ARAUJO, J.C.; ALMEIDA, P.G.S.; CHERNICHARO, C.A.L.; SANZ, J.L.; SOUZA, E.C.; NASCIMENTO, A. M. A. Organic loading rate and food-to-microorganism ratio shape prokaryotic diversity in a demo-scale up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating domestic wastewater. *Antonie van Leeuwenhoek*, p. 2013.
- RIVIERE, D.; DESVIGNES, V.; PELLETIER, E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBACH, J.; LI, T.; CAMACHO, P.; SGHIR, A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *The ISME Journal*, v. 3, p. 700–714, 2009.
- SANTOS, J. M.; LOPES, E. S.; REIS, N. C.; DE SA, L. M.; HORAN, N. J. Mathematical modelling of hydrogen sulphide emission and removal in aerobic biofilters comprising chemical oxidation. *Water Research*, v. 43, n. 14, p. 3355-3364, 2009.
- SHANKS, O. C.; NEWTON, R. J.; KELTY, C. A.; HUSE, S. M.; SOGIN, M. L.; MC LELLAN, S. L. Different geographic locales structures of untreated wastewaters from comparison of the microbial community. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, n. 9, p. 2906-2912, 2013.
- SIEFERT, E. IRGENS, R.L.; PFENNIG, N. Phototrophic purple and green bacteria in a sewage treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* v.35, p. 38–44, 1978.
- SILVA, A. J.; VARESCHE, M. B., FORESTI, E. ZAIAT, M. Sulphate removal from industrial wastewater using a packed-bed anaerobic reactor. *Process Biochemistry*. 37: 927-935, 2002.
- SILVA, A. J. Biodessulfatação com posterior oxidação parcial do sulfeto em reatores operados em bateladas seqüenciais. São Carlos. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo., p. 174, 2005.
- SINISCLACHI, L.A. Investigação e Enriquecimento de microrganismos metanotróficos a partir de lodo de reator UASB tratando esgoto doméstico. 90f. Qualificação de doutorado. Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- SOUZA, C.L.; SILVA, S. Q.; AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Production and characterization of scum and its role in odour control in UASB reactors treating domestic wastewater. *Water Science and Technology*, v.54, n.9, p.201-208, 2006.
- SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Archae Press, Nashville, 1996.
- STAL, L.J. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytol*, v.131, p.1-32, 1995.

- STEUDEL, R. The chemical sulfur cycle. In: Lens PNL, Hulshoff Pol LW (eds). Environmental technologies to treat sulfur pollution: principles and engineering. IWA publishing, London, UK, p.1-31, 2000.
- 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.1-22, 2009.
- TILMAN, D.; REICH, P.B.; KNOPS, J.M.H. Biodiversity and ecosystem stability in a decade-long grassland experiment. *Nature*, v.441, n. 7093, p.629-632, 2006.
- TORTORA, G. J.; FUNKI, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia, 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- TROIS, C.; COULON, F. COMBRET, C.O.; MARTINS, J.M. OXARANGO, L. Effect of pine bark and compost on the biological denitrification process of non-hazardous landfill leachate: focus on the microbiology. *J. Hazard Mater*, v. 181, p. 1163-1169, 2010.
- [U. S. EPA] U. S. Environmental Protection Agency. Process design manual for sulfide control in sanitary sewerage systems. Washington (DC); U.S. EPA – 625-1-74-005, 1995.
- VAN DEN ENDE, F., van GEMERDEN, H. Sulphide oxidation under oxygen limitation by a *Thiobacillus thioparus* isolated from a marine microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol*, v. 13 (1), p. 69–87, 1993.
- VAN DER ZEE, F.P.; VILLAVERDE, S.; GARCÍA, P.A.; FDZ-POLANCO, F. Sulfide removal by moderate oxygenation of anaerobic sludge environments. *Bioresour. Technology*. 98:518-524, 2007.
- VANNINI, C.; MUNZ, G.; MORI, G.; LUBELLO, C.; VERNI, F.; PETRONI, G. Sulphide oxidation to elemental sulphur in a membrane bioreactor: Performance and characterization of the selected microbial sulphur-oxidizing community. *Systematic and Applied Microbiology*, v.31, p.461-473, 2008.
- VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. Microbial Colonization of Polyurethane Foam Matrices in Horizontal Flow Anaerobic Immobilized Sludge (HAIS) Reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 48, No. 4, pp. 538 – 543, 1997.
- XU, X.J.; CHEN, C.; WANG, A.J.; FANG, N.; YUAN, Y.; REN, N.; LEE, D.J. Enhanced elementary sulfur recovery in integrated sulfate-reducing, sulfur-producing reactor under micro-aerobic condition. *Bioresour. Technology*, v.116, p.517-521, 2012.
- WILLIAMS, T. M. e UNZ, R.F. Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: characterization of *Thiothrix*, *Beggiatoa*, and Eikelboom type 021N strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, n.4, p.887-898, 1985.
- WRIGHTON, K.C.; VIRDIS, B.; CLAUWAERT, P.; READ, S.T.; DALY, R.A.; BOON, N.; PICENO, Y.; ANDERSON, G.L.; COATES, J.D.; RABAEY, K. Bacterial community structure corresponds to performance during cathodic nitrate reduction. *ISME J.*, v.4, n.11, p. 1443-1445, 2010.
- YANG, W.; VOLLERTSEN, J.; JACOBSEN, T. Anoxic sulfide oxidation in wastewater of sewer networks. *Water Science and Technology*, v.52, p.191-199, 2005.
- ZHANG, D.; YANG, H.; ZHANG, W.; HUANG, Z.; LIU, S.J. *Rhodocista pekingensis* sp. nov., a cyst-forming phototrophic bacterium from a municipal wastewater treatment plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.53, p.1111-1114, 2003
- ZHANG, L.; SCHRYVER, P.; GUSSEME, B.; MUYNCK, W.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer systems: A review. *Water Research*, v.42, n.1-2 p.1-12, 2008.
- ZHANG, X.Q.; ZHANG, W.J.; WEI, B.P.; XU, X.W.; ZHU, X.F.; WU, M. *Meiothermus cateniformans* sp. nov., a slightly thermophilic species from north-eastern China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p. 840–844, 2010.

10 APÊNDICE

APÊNDICE A - Equações utilizadas para realização dos cálculos apresentados na tabela 6.2.

Reator	Especificação	Equações	Observações
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Volume de lodo	VL	Volume de lodo retirado dos reatores
R2(24h)	Volume de espuma	VE	Volume de espuma retirado dos reatores
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Volume total de biofilme	VTB	Volume total de biofilme nos reatores contendo meio suporte
UASB, R1(24h, 12h e 6h) e R2 (24h, 12h e 6h)	Dias de operação	d	Todos os dias de operação dos reatores
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (24h, 12h e 6h)	Vazão (L/d)	Q	Volume do reator (L)/ tempo de detenção hidráulica (d)
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Número de meio suporte	n_{suporte}	Número amostral de meio suporte para análises de enxofre elementar e STV (5 anéis e 5 biobob)
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Número total de meio suporte	T_{suporte}	Número total de meio suporte presente nos reatores, R1 com 230 anéis plásticos e R2-12h e 6h com 90 biobob.
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Sólidos totais voláteis do lodo	STVL	Sólidos totais voláteis presente na amostra de lodo dos reatores
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Sólidos totais voláteis do biofilme	STVB	Sólidos totais voláteis realizados com 5 meio suporte
R2(24h)	Sólidos totais voláteis da espuma	STVE	Sólidos totais voláteis medidos na espuma retirada do reator

R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Média de enxofre no lodo	$MS^{\circ}L$	Média dos dados de enxofre do lodo dos reatores
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Média de enxofre no biofilme	$MS^{\circ}B$	Média dos dados de enxofre do biofilme dos reatores
R2(24h)	Média de enxofre na espuma	$MS^{\circ}E$	Média dos dados de enxofre da espuma do reator
UASB	Massa das espécies de enxofre (S) afluyente (mg)	$MS^{\circ}A = CSA \times Q \times d$	Massa das espécies de enxofre (S) afluyente = concentração de enxofre afluyente(mg/L) x vazão (L/d) x n° de dias
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Massa das espécies de enxofre (S) efluente (mg)	$MS^{\circ}E = CSE \times Q \times d$	Massa das espécies de enxofre efluente = concentração de enxofre efluente (mg/L) x vazão (L/d) x n° de dias
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Massa enxofre do lodo (mg)	$MAS^{\circ}L = MS^{\circ}L \times VL$	Massa enxofre do lodo = Média enxofre do lodo (mg/L) x Volume de lodo retirado dos reatores (L)
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Massa de enxofre do biofilme (mg)	$MAS^{\circ}B = MS^{\circ}B \times VTB / (n_{\text{suporte}} \times T_{\text{suporte}})$	Massa de enxofre do biofilme = Média enxofre do biofilme (mg/L) x Volume total de biofilme do reator/ n° de meio suporte amostrado x total de meio suporte no reator
R2 (24h)	Massa de enxofre da espuma (mg)	$MAS^{\circ}E = MS^{\circ}E \times VE$	Massa de enxofre da espuma = Média enxofre da espuma (mg/L) x Volume de espuma retirada do reator (L)
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Massa de enxofre total (mg)	$MT = MAS^{\circ}L + MAS^{\circ}B$	Massa de enxofre total = Massa de enxofre do lodo + Massa de enxofre do biofilme
R2 (24h)	Massa de enxofre total (mg)	$MT = MAS^{\circ}L + MAS^{\circ}E$	Massa de enxofre total = Massa de enxofre do lodo + Massa de enxofre da espuma

R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Massa de sólidos totais voláteis no biofilme (g)	$MA_{STVB} = STVB \times VTB / (n_{suporte} \times T_{suporte})$	Massa de Sólidos totais voláteis no biofilme = Sólidos totais voláteis do biofilme x volume total de biofilme/ n° de meio suporte amostrado x total de meio suporte no reator
R2(24h)	Massa de sólidos totais voláteis na espuma (g)	$MA_{STVE} = STVE \times VE$	Massa de Sólidos totais voláteis na espuma = Sólidos totais voláteis da espuma x volume de espuma retirado do reator
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (24h, 12h e 6h)	Massa de sólidos totais voláteis do lodo	$MA_{STVL} = STVL \times VL$	Massa de STV do lodo = sólidos totais voláteis do lodo x volume de lodo retirado dos reatores
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (12h e 6h)	Relação específica (mgS/gSTV) do biofilme	$RE_b = MAS^{\circ}B/MA_{STVB}$	Relação específica do biofilme = Massa de enxofre do biofilme/massa de Sólidos totais voláteis do biofilme
R2 (24h)	Relação específica (mgS/gSTV) da espuma	$RE_e = MAS^{\circ}E/MA_{STVE}$	Relação específica da espuma = Massa de enxofre da espuma/massa de Sólidos totais voláteis da espuma
R1(24h, 12h e 6h) e R2 (24h, 12h e 6h)	Relação específica (mgS/gSTV) no lodo	$RE_L = MAS^{\circ}L/MA_{STVL}$	Relação específica no lodo = Massa de enxofre do lodo/massa de Sólidos totais voláteis do lodo

APÊNDICE B - Abundância relativa dos principais gêneros encontrados nos reatores e as funções metabólicas que os membros desses gêneros poderiam exercer nos reatores.

	Gênero	R1-24h	R2-24h	R1-12h	R2-12h
Hidrolíticas	<i>Aminiphilus</i>	7,5%	1,2%	1,0%	0,7%
	<i>Aminobacterium</i>	11,9%	7,9%	12,4%	5,5%
	<i>Singulisphaera</i>	1,1%	0,1%	0,3%	0,1%
	<i>Cloacibacillus</i>	0,7%	0,6%	0,4%	1,4%
	<i>Synergistes</i>	1,3%	1,4%	0,8%	1,7%
	<i>Clostridium</i>	0,2%	0,1%	0,2%	0,1%
	<i>Eubacterium</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%
	Total	22,9%	11,2%	15,1%	9,5%
Acidogênicas	<i>Acidaminococcus</i>	0,0%	0,3%	0,0%	0,5%
	<i>Anaeroarcus</i>	0,2%	0,4%	0,0%	0,5%
	<i>Phascolarctobacterium</i>	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%
	<i>Pseudolabrys</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
	Total	0,4%	0,7%	0,0%	1,3%
Acetogênicas	<i>Propionispira</i>	0,2%	0,0%	0,0%	1,0%
	<i>Succinispira</i>	0,7%	0,0%	0,0%	0,0%
	<i>Aminomonas</i>	21,0%	17,1%	11,3%	16,3%
	<i>Bacteroides</i>	0,0%	0,3%	0,0%	0,3%
	<i>Paludibacter</i>	0,0%	0,4%	0,5%	0,2%
	Total	21,9%	17,9%	11,9%	17,8%
Metanogênicas	<i>Methanobacterium</i>	17,0%	0,9%	1,7%	1,7%
	<i>Methanobrevibacter</i>	0,1%	0,0%	0,1%	0,1%
	Total	17,1%	0,9%	1,8%	1,9%
Bactérias não sulfurosas	<i>Deinococcus</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,6%
	<i>Chloroflexus</i>	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
	<i>Rhodocista</i>	0,0%	0,7%	0,0%	0,2%
	<i>Rhodobacter</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%
	<i>Blastochloris</i>	0,8%	1,0%	0,3%	0,2%
	<i>Rhodopseudomonas</i>	0,3%	5,1%	0,4%	1,3%
	<i>Roseospira</i>	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
	<i>Rodocyclus</i>	0,0%	0,6%	0,0%	0,7%
	<i>Rhodoplanes</i>	0,1%	0,1%	0,0%	0,0%
	Total	1,2%	6,8%	0,9%	2,4%
Bactérias sulfurosas*	<i>Chlorobium</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	<i>Thiorhodococcus</i>	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
	<i>Halochromatium</i>	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%
	<i>Lamprocystis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	<i>Chromatiales</i>	1,8%	0,8%	1,9%	0,7%
	<i>Thiobaca</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,4%
	<i>Thiocapsa</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	<i>Thiococcus</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

	<i>Sulfuricurvum</i>	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
	<i>Thiomonas</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	<i>Dyella</i>	0,0%	0,2%	0,0%	0,2%
	<i>Meiothermus</i>	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
	Total	1,6%	1,0%	1,9%	0,8%
Desnitrificantes	<i>Roseomonas</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%
	<i>Gulbenkiania</i>	0,0%	4,4%	0,0%	8,6%
	<i>Stenotrophomonas</i>	0,0%	0,2%	0,1%	0,6%
	<i>Thermomonas</i>	0,0%	8,0%	0,0%	4,8%
	<i>Azospira</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%
	<i>Lysobacter</i>	0,0%	4,1%	0,1%	5,5%
	<i>Rhizobium</i>	0,0%	0,1%	0,1%	0,1%
	<i>Soehngenia</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%
	<i>Azonexus</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%
	<i>Azospirillum</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
	Total	0,3%	17,1%	0,3%	20,0%
Redutoras de sulfato	<i>Desulfonema</i>	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
	<i>Desulfovibrio</i>	0,2%	0,2%	0,6%	0,0%
	<i>Desulfomonile</i>	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%
	<i>Desulforhabdus</i>	0,2%	0,0%	0,1%	0,0%
	Total	0,6%	0,2%	0,8%	0,0%

* No grupo de bactérias sulfúreas foi considerada na somatória dos gêneros, a abundância relativa da ordem *Chromatiales*.