

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

**ESTRUTURA E DINÂMICA DA COMUNIDADE  
BACTERIANA PRESENTE EM REATORES DE  
OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DE SULFETO.**

**Renata Côrtes de Oliveira Diniz**

**Belo Horizonte**

**2015**

**ESTRUTURA E DINÂMICA DA COMUNIDADE  
BACTERIANA PRESENTE EM REATORES DE  
OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DE SULFETO.**

**Renata Côrtes de Oliveira Diniz**

# **ESTRUTURA E DINÂMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE EM REATORES DE OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DE SULFETO.**

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

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

Orientador: Prof<sup>a</sup> Juliana Calábria de Araújo

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia da UFMG  
2015

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por tudo que sempre fez e faz por mim, pelo seu amor imensurável que traz paz em todos os momentos. Por mostrar o seu caminho, que é o certo e o único a seguir, por cuidar de mim colocando em minha vida pessoas que foram muito importantes para um grande aprendizado. Deus maravilhoso que me abençoou no final desta caminhada, com o maior presente de todos, minha filha Eduarda!

“Bendito o homem que confia no Senhor, e cuja confiança é o Senhor. Porque será como a árvore plantada junto às águas, que estende as suas raízes para o ribeiro, e não receia quando vem o calor, mas a sua folha fica verde; e no ano de sequeidão não se afadiga, nem deixa de dar fruto.”  
Jeremias 17:7-8

A minha mãe maravilhosa que sempre me apoia, que sempre está ao meu lado acreditando em mim. Aos meus irmãos pela torcida, carinho e amizade.

Ao meu amado marido Marcelo, outro presente de Deus, pelo seu amor, por ser um companheiro maravilhoso, caminhando comigo, me apoiando em todos os momentos.

Aos meus amigos e familiares, que me apoiaram e entenderam os momentos de ausência. A Ana Paula Campos, que sempre esteve perto mesmo morando longe, seu incentivo foi o início de tudo.

A querida orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Calábria pela oportunidade e pelo apoio na pesquisa!

A toda equipe do projeto: Grazi, Sarinha, Vitor, Eider, Merly e Ana sem os quais eu não teria chegado onde cheguei. Obrigada pelo apoio em cada etapa deste trabalho. Aos meus companheiros e amigos de laboratório Cíntia, Lu, Alyne, Erika, Ana Maria, Adriana, Karol, Izabel, Jéssica, Alessandra, Lívia, Thaís e Marcela. Agradeço a todas pelo apoio em todos os momentos!!

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

A CAPES pela bolsa concedida e a FINEP pelo financiamento do projeto, apoios importantes para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, pela oportunidade!

## RESUMO

Neste estudo foram desenvolvidos dois reatores com o objetivo de promover a oxidação biológica do sulfeto dissolvido presente em efluente de reator UASB, objetivando o estudo da estrutura, dinâmica e comportamento da comunidade bacteriana formada ao longo do tempo. O desempenho dos reatores foi monitorado ao longo de 500 dias e preenchidos com materiais suportes distintos: anéis de polipropileno e espuma de poliuretano. Os reatores foram operados em três condições operacionais diferentes, representadas pelos tempos de detenção hidráulica de 24, 12 e 6 horas, respectivamente. Os parâmetros físico-químicos sulfeto, sulfato, tiosulfato, enxofre elementar, pH e potencial redox foram monitorados. As análises microbiológicas realizadas foram DGGE e microscopia óptica. Os resultados demonstraram maior eficiência de remoção de sulfeto (cerca de 90%) em ambos os reatores quando operados com TDH de 12h. A técnica de PCR-DGGE revelou que a comunidade bacteriana foi extremamente diversificada e muito dinâmica variando ao longo do tempo dentro de um mesmo reator e na mesma fase operacional, bem como entre os reatores. A redução do TDH de 24h para 12h alterou a estrutura da comunidade e em alguns casos acarretou redução da diversidade. Bactérias fototróficas púrpuras e verdes envolvidas na oxidação de sulfeto relacionadas à *Chromatiaceae*, *Chlorobiaceae* foram detectadas em ambos os reatores. Os resultados de microscopia óptica revelaram à predominância de colônias de sulfobactérias púrpuras similares a família *Chromatiaceae* em todas as fases operacionais de ambos os reatores. O balanço de massa de enxofre e o índice de Shannon revelou que o R1 no TDH de 6h, contendo meio suporte anel plástico demonstrou a melhor condição operacional para remoção biológica de sulfeto. Este trabalho mostrou que a configuração dos reatores juntamente com uma biomassa estabilizada em ambos os materiais suporte, pode ser usada para promover a remoção eficiente de sulfeto dissolvido do efluente de reatores anaeróbios, tratando esgotos sanitários.

## ABSTRACT

This study developed two reactors with the aim of promoting the biological oxidation of dissolved sulfide present in UASB reactor effluent in order to predict the structure and dynamic behavior of the bacterial community over time. The performance of the reactors was monitored over 500 days and filled with different packed materials: polypropylene rings and polyurethane foam. The reactors were operated in three different operating conditions, represented by the hydraulic retention times of 24, 12 and 6 hours, respectively. The physical and chemical parameters sulfide, sulfate, thiosulfide, elemental sulfur, pH and redox potential were monitored. The microbiological analyzes were PCR-DGGE and optical microscopy. The results showed higher sulfide removal efficiency (about 90%) in both reactors when operated at HRT of 12 hours than that observed at HRT of 24 hours. The PCR-DGGE technique revealed that the bacterial community was extremely diverse and very dynamic varying over time within the same reactor and at the same operational phase, and between the reactors. The reduction in HRT from 24h to 12h changed the bacterial community structure and in some cases reduced the diversity. Phototrophic purple and green bacteria involved in the oxidation of sulfide related to *Chromatiaceae*, *Chlorobiaceae* were detected in both reactors. The results of microscopic examination showed the predominance of purple bacterial colonies with morphology similar to *Chromatiaceae*- like cells in all operational phases of both reactors. The sulfur mass balance and the Shannon index showed that reactor 1 (R1) at HRT of 6 hours, filled with polypropylene rings, was the best operating condition for biological removal of sulfide. This work showed that the configuration of the reactor together with a stabilized biomass can be used to remove sulfide from the effluent of anaerobic reactors treating sewage.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 CICLO DO ENXOFRE.....	4
3.2 CARACTERÍSTICAS DO ÍON SULFATO .....	6
3.2.1 <i>Redução Assimilatória do Sulfato</i> .....	7
3.2.2 <i>Redução Desassimilatória do sulfato</i> .....	7
3.3 CARACTERÍSTICAS DO ÍON SULFETO .....	8
3.4 PROBLEMAS RELACIONADOS COM FORMAÇÃO DE SULFETOS EM SISTEMAS ANAERÓBIOS.....	9
3.5 PROCESSOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE SULFETO EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS .....	12
3.6 OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DE SULFETO .....	14
3.6.1 <i>Oxidação de sulfeto por sulfobactérias incolores</i> .....	18
3.6.2 <i>Oxidação de sulfeto por sulfobactérias verdes e púrpuras</i> .....	21
3.6.3 <i>Mecanismos e enzimas envolvidas na oxidação biológica de sulfeto em quimiolitotróficas</i> .....	23
3.6.4 <i>Mecanismos e enzimas envolvidas na oxidação biológica de sulfeto em sulfobactérias verdes e púrpuras</i> .....	25
3.7 OXIDAÇÃO BIOLÓGICA E QUÍMICA DO ENXOFRE ELEMENTAR .....	26
3.8 INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES .....	27
3.9 REATORES UTILIZADOS NO PROCESSO DE OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DE SULFETO .....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1 APARATO E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	36
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	39
4.2.1 <i>pH e potencial redox</i> .....	39
4.2.2 <i>Sulfeto</i> .....	39
4.2.3 <i>Sulfato</i> .....	40
4.2.4 <i>Tiosulfato</i> .....	41
4.2.5 <i>Enxofre elementar</i> .....	41
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	42
4.3.1 <i>Extração de DNA</i> .....	42
4.3.2 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)</i> 42	42
4.3.3 <i>Caracterização morfológica dos microrganismos presentes no biofilme dos reatores R1 e R2 em ambas as fases operacionais por microscopia óptica comum</i> .....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1 DESEMPENHO DOS REATORES DE OXIDAÇÃO BIOLÓGICA DE SULFETO .....	46
5.1.1 <i>Monitoramento das concentrações de sulfeto, sulfato e enxofre elementar dos pontos afluente e efluente dos reatores</i> .....	46
5.1.2 <i>Relação entre pH e potencial redox do afluente e efluente dos reatores</i> .....	51
5.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DOS REATORES NAS DIFERENTES FASES OPERACIONAIS ...	53
5.2.1 <i>Análise por microscopia óptica dos micro-organismos presentes nos reatores</i> .....	53
5.2.2 <i>Caracterização da estrutura da comunidade bacteriana dos reatores R1 e R2</i> .....	56
5.2.3 <i>Comparação do perfil de bandas da comunidade bacteriana de cada reator</i> .....	67
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3-1:</b> Ciclo global do enxofre. ....	5
<b>Figura 3-2:</b> Representação esquemática do ciclo biológico do enxofre. ....	5
<b>Figura 3-3:</b> Bioquímica da redução desassimilativa do íon sulfato. ....	7
<b>Figura 3-4:</b> Distribuição percentual das espécies de sulfeto em meio aquoso para diferentes valores de pH, para a temperatura de 25°C. ....	9
<b>Figura 3-5:</b> Toxicidade do sulfeto de hidrogênio. ....	11
<b>Figura 3-6:</b> Processos químicos e biológicos para controle da emissão de H <sub>2</sub> S. ....	13
<b>Figura 3-7:</b> Ciclo do enxofre e seus estados de oxidação. ....	16
<b>Figura 3-8:</b> (e-h) Gêneros da família <i>Chromatiaceae</i> , com detalhe para a morfologia semelhante e diferente distribuição dos grânulos intracelulares de enxofre. Legenda: (e) <i>Chromatium okenii</i> ; (f) <i>Allochromatium vinosum</i> ; (g) <i>Thiocystis violacea</i> ; (h) <i>Thiocystis gelatinosa</i> . Escala: 5µm. Fonte: BRENNER 2005a. ....	22
<b>Figura 3-9:</b> Bioquímica da oxidação de sulfeto por bactérias quimiolitotróficas. ....	24
<b>Figura 3-10:</b> Membrana fotossintética em sulfobactérias púrpuras. ....	25
<b>Figura 4-1:</b> Foto do aparato experimental constituído pelo reator UASB em escala piloto e por dois reatores destinados a remoção biológica de sulfeto (R1 e R2) (GARCIA , 2014). ...	36
<b>Figura 4-2:</b> 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 material suporte (5) tampa transparente (6) saída do efluente (GARCIA, 2014). ....	37
<b>Figura 4-3:</b> Materiais suporte: a) Biobob®; b) anel plástico. ....	37
<b>Figura 5-1:</b> Box-plot das concentrações de sulfeto (afluente e efluente) dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais (Garcia, 2014). ....	46
<b>Figura 5-2:</b> Eficiência de remoção de sulfeto nos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais. (GARCIA, 2014). ....	48
<b>Figura 5-3:</b> Diagrama de Pourbaix S/H <sub>2</sub> 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. ....	53
<b>Figura 5-4:</b> (a-d) Imagens da biomassa microbiana que se desenvolveu durante a oxidação biológica de sulfeto nos reatores R1 e R2. Legenda: (a) espuma formada no R2-24h (sem meio suporte); (b) biofilme formado no reator R1-24h; (c) biofilme formado no reator R2-12h; (d) aparência da superfície do reator R1-24h, com detalhe do material suporte com pontos brancos correspondentes ao enxofre elementar. ....	54
<b>Figura 5-5:</b> (i-k) Microscopia óptica da biomassa retirada do reator R1 com material suporte anel plástico. Legenda: (i) R1-24h; (j) R1-12h; (k) R1-6h. ....	55
<b>Figura 5-6:</b> (l-n) Microscopia óptica da biomassa retirada do reator R2. Legenda: (l) R2-24h sem meio suporte; (m) R2-12h e (n) R2-6h com material suporte Biobob. ....	55
<b>Figura 5-7:</b> Análise da comunidade bacteriana usando eletroforese desnaturante (DGGE). Perfil do DGGE da comunidade bacteriana amostrados em momentos diferentes ao longo das três fases operacionais dos reatores 1 e 2: (a) as fases 1 e 2 (TDH 24 e 12 h); (b) as fases 2 e 3 (TDH de 12 e 6h). ....	57
<b>Figura 5-8:</b> 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. ....	67
<b>Figura 5-9:</b> Dendograma do perfil da comunidade bacteriana do DGGE dos reatores 1(suporte: anel plástico) e 2 (suporte: Biobob), nas duas diferentes fases operacionais (TDH de 12h e 6h). À direita contém os dados quanto a especificação do reator, TDH e amostra; à esquerda indica a porcentagem de similaridade e identificação dos grupos. ....	69



**Figura 5-10:** 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.....71

**Figura 5-11:** Índice de Shannon das amostras dos reatores 1 e 2 nas duas diferentes fases operacionais ( TDH de 12h e 6h). Legenda: R1-12: amostras do reator 1, preenchido por anéis plásticos, no TDH de 12h. R1 - 6: amostras do reator 1 , preenchido por anéis plásticos, no TDH de 6h. R2-12: amostras do reator 2, preenchido por biobob, no TDH de 12h. R2-6: amostras do reator 2, preenchido por biobob, no TDH de 6h. .... 72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3-1:</b> Efeitos da formação de sulfeto em reatores anaeróbios.....	11
<b>Tabela 3-2:</b> Reações de oxidação de sulfeto por sulfobactérias quimiolitotróficas....	15
<b>Tabela 3-3:</b> Caracterização de reatores biológicos utilizados para remoção de sulfeto .....	35
<b>Tabela 4-1:</b> Características dos materiais suporte.....	37
<b>Tabela 4-2:</b> Fases operacionais e características dos reatores.....	38
<b>Tabela 4-3:</b> Parâmetros de análise, métodos analíticos, frequência e pontos de amostragem.....	39
<b>Tabela 4-4:</b> Principais características do par de iniciadores usado na PCR-DGGE.	43
<b>Tabela 4-5:</b> Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR. .....	43
<b>Tabela 5-1:</b> Resultados do balanço de massa de enxofre entre o afluente e efluente dos reatores 1 e 2 nas três fases operacionais estudadas. ....	50
<b>Tabela 5-2:</b> Quantidade de enxofre elementar e sulfato formados em um mês de operação dos reatores em cada tempo de detenção hidráulica (24, 12 e 6 horas). ...	50
<b>Tabela 5-3:</b> Valores médios de pH e potencial redox do afluente e efluente dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.....	51
<b>Tabela 5-4:</b> Posição taxonômica das bandas do DGGE obtidas das amostras dos reatores R1 e R2 (TDH 24 h, 12h e 6 h), 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 das amostras coletadas dos reatores 1 e 2 no TDH de 24 h, 12 h e 6 h, através da ferramenta BLAST, apresentando a porcentagem de similaridade.....	57
<b>Tabela 5-5:</b> Diversidade de micro-organismos encontrados nos reatores 1 e 2 em cada fase operacional (24 h, 12 h e 6 h). ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**ADP:** Adenosina Difosfato

**AMP:** Adenosina Monofosfato

**AlCl<sub>3</sub>:** Cloreto de Alumínio

**APS:** Adenosina Fosfossulfato

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**BaCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Bário

**BaSO<sub>4</sub>:** Sulfato de Bário

**Bis:** N, N'-metileno bis acrilamida

**BRS:** Bactérias redutoras de sulfato

**CePTS:** Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono

**CONAMA:** Conselho Nacional do Meio Ambiente

**CHCl<sub>3</sub>:** Clorofórmio

**CuFeS<sub>2</sub>:** Calcopirita

**CuS:** Sulfeto de Cobre

**CaSO<sub>4</sub>:** 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

**FeS<sub>2</sub>:** Pirita

**HS<sup>-</sup>:** sulfeto

**H<sub>2</sub>S:** sulfeto de hidrogênio

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura

**NaOH:** hidróxido de sódio

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:** íon amônio

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** 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

**S<sup>0</sup>:** Enxofre Elementar

**S<sup>2-</sup>:** Sulfeto

**S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>:** Tiosulfato

**SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>:** 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 anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo.

# 1 INTRODUÇÃO

Os reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) vêm sendo amplamente empregados para o tratamento de águas residuárias domésticas e industriais. Apesar das vantagens, alguns subprodutos indesejáveis, como o sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), são formados. Este pode estar presente na forma dissolvida e gasosa, e é produzido por bactérias redutoras de sulfato, sob condições anaeróbias. Uma vez que o sulfeto dissolvido pode ser desprendido do efluente dos reatores UASB para a atmosfera, problemas relacionados à sua toxicidade, demanda de oxigênio, corrosão e mau odor podem ocorrer. Ademais, a exposição dos seres humanos a este gás pode trazer vários danos à saúde, tais como dores de cabeça, náuseas, edema pulmonar e até parada cardíaca (JENSEN *et al.*, 1995). Portanto, a remoção do sulfeto dissolvido se faz necessária e pode ser realizada através de métodos químicos ou biológicos.

Existem diferentes tipos de processos físico-químicos para a remoção de sulfeto dissolvido, mas esses processos possuem alto custo operacional e de manutenção (MANZ, 1992). O método biológico para remoção do sulfeto utiliza sulfobactérias, que podem ser aeróbias ou anaeróbias, quimiolitotróficas ou fototróficas. O processo biológico que ocorre em condições anaeróbias é uma alternativa vantajosa, pois não gera odor, apresenta simplicidade operacional, baixo custo e pode ser utilizado para tratar efluentes de reatores UASB.

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). A recuperação do enxofre elementar é muito valiosa pelo fato do enxofre poder ser novamente empregado em processos industriais, como na produção de ácido sulfúrico, ou na agricultura, na composição de fertilizantes, fungicida, entre outros processos (VANNINI *et al.*, 2008; KLOK *et al.*, 2012).

Entretanto, apesar da relevância, são raros os estudos que avaliaram a remoção biológica de sulfeto de hidrogênio, e também promoveram a recuperação de enxofre elementar, a partir de efluente anaeróbio proveniente de esgoto doméstico tratado, que contém concentrações baixas de sulfeto de hidrogênio dissolvido, da ordem de 1,0 a 6,0 mg/L (GARCIA, 2014).

Silva *et al.* (2005) realizaram uma caracterização morfológica de micro-organismos presentes na espuma e Souza *et al.* (2006) e Garcia *et al.* (2012) investigaram a presença de grupos de

micro-organismos envolvidos na oxidação de sulfeto presentes na espuma formada no decantador de um reator UASB. Os resultados mostraram a presença de micro-organismos similares a *Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Thiotrix*, *Chlorobium*, *Phormidium* e *Oscillatoria*. Espécies pertencentes a tais gêneros podem estar envolvidas na oxidação biológica de sulfeto, e já foram reportadas na literatura em sistemas de tratamento de águas residuárias.

De acordo com Ferrera *et al.* (2004), a maioria dos sistemas para oxidação biológica de sulfeto, propostos na literatura utiliza culturas puras de sulfobactérias com crescimento em suspensão em 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 poderia ser evitado pela utilização de reatores com biofilme, que proporcionam maior estabilidade ao sistema.

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). Não obstante, a maioria desses estudos investigou 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. Poucos são os estudos que investigaram a remoção biológica de sulfeto de efluente de reatores anaeróbios tratando esgotos, contendo baixa concentração de sulfeto dissolvido, e que analisaram a estrutura da comunidade bacteriana formada nos reatores.

Este trabalho esteve inserido em um projeto maior (GARCIA, 2014) que objetivava promover a oxidação biológica de sulfeto e a recuperação de enxofre elementar em dois reatores de leito fixo, a partir de efluente anaeróbio. O projeto foi financiado pela FINEP através da CHAMADA PÚBLICA MCT/MCIDADES/FINEP/Ação Transversal SANEAMENTO AMBIENTAL E HABITAÇÃO - 7/2009, no tema: Desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias de tratamento terciário de esgoto sanitário, visando conjuntamente à remoção e à recuperação de nutrientes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivo geral***

Investigar a estrutura e dinâmica da comunidade bacteriana em dois reatores de oxidação biológica de sulfeto contendo materiais suportes diferentes.

### **2.2 *Objetivos específicos***

- Caracterizar a comunidade bacteriana desenvolvida em cada reator.
- Verificar o efeito das condições operacionais e do tipo de material suporte sobre a eficiência de remoção biológica de sulfeto e formação de enxofre.
- Avaliar efeito do material suporte e tempo de detenção hidráulica sobre a estrutura e dinâmica da comunidade bacteriana.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 *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. O enxofre pode estar presente na forma de sulfetos metálicos como a pirita ( $\text{FeS}_2$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e na forma de gesso ( $\text{CaSO}_4$ ).

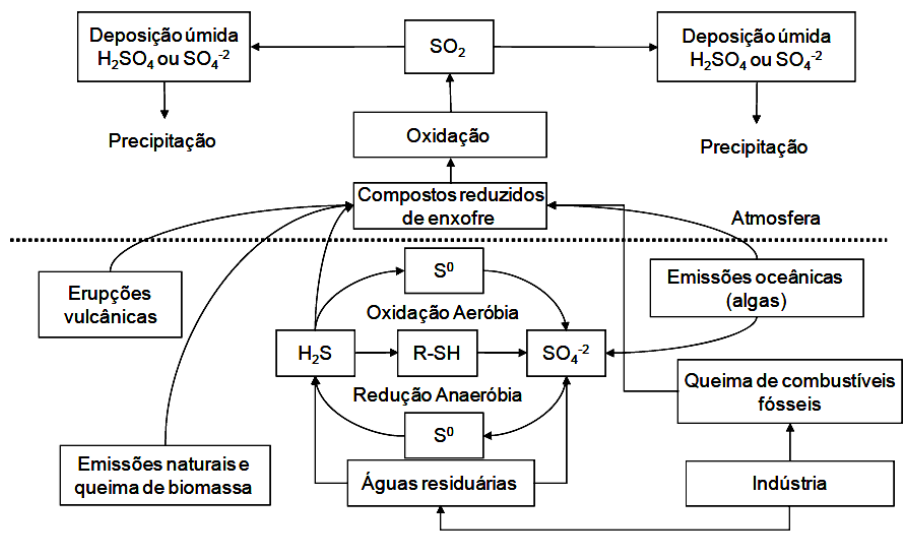
O enxofre na forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) é um dos ânions mais abundantes no mar. O sulfato é largamente utilizado como matéria prima de muitos processos industriais, como a indústria de papel e celulose, indústria açucareira, indústria de borracha e pneumáticos, inseticidas e fungicidas, 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, e está contido em diversos aminoácidos na forma de radical sulfidrílica (-SH), além de ser componente essencial de várias coenzimas. No ar, pode-se encontrar dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), sulfeto de hidrogênio e dimetilsulfeto, sendo que na forma de  $\text{H}_2\text{S}$  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 o sulfato, que é o ânion de maior prevalência em corpos d'águas naturais (BITTON, 2005). As transformações de enxofre podem ser visualizadas de forma simplificada na figura 3.1.

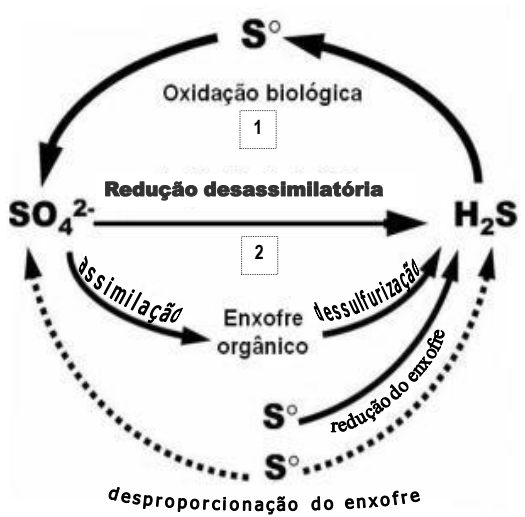




**Figura 3-1:** Ciclo global do enxofre.

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 microrganismos 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 3.2.



**Figura 3-2:** Representação esquemática do ciclo biológico do enxofre.

Legenda: 1 – bactérias oxidadoras de sulfeto (incolores, púrpuras e verdes). 2 – Bactérias redutoras de sulfato.

Fonte: Adaptado de TANG *et al.*(2009).

Conforme figura 3.2, vários microrganismos 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 a sulfato (figura 3.2 n.1) por uma variedade de microrganismos quimiolitotróficos e fototróficos. Por sua vez, o sulfato é reduzido de volta a sulfeto (figura 3.2 n.2) por bactérias redutoras de sulfato (TANG *et al.*, 2009).

### **3.2 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 30 a 250 mg/L (WEF, 1995) e entre 50 a 3000 mg.L 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.

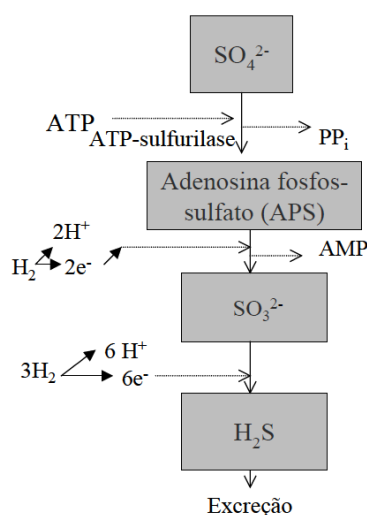
Apesar do íon sulfato ser um composto não tóxico e não volátil, a sua emissão é considerada ambientalmente impactante, pois a alta concentração do íon provoca um desbalanceamento no ciclo biogeoquímico do enxofre. De forma geral, os impactos causados pelo sulfato dependem da forma de emissão e da localidade,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

### 3.2.1 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  $\text{SO}_4^{2-}$  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  $\text{H}_2\text{S}$  pode resultar da decomposição anaeróbia, por bactérias proteolíticas (*Clostridium*, *Vellionella*), da matéria orgânica contendo aminoácidos de enxofre (S), tais como metionina, cisteína e cistina (MADIGAN *et al.*, 2010).

### 3.2.2 Redução Desassimilatória do sulfato

A redução desassimilatória do sulfato é a mais importante fonte de  $\text{H}_2\text{S}$  em sistemas anaeróbios de tratamento de esgotos sanitários. Essa redução é realizada por bactérias redutoras de sulfato (BRS), microrganismos anaeróbios estritos pertencentes a diversos gêneros, incluindo *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfomonas*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfobacterium* e *Thermodesulfobacterium*. A redução desassimilativa do íon sulfato (figura 3.3) 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 3-3:** Bioquímica da redução desassimilativa do íon sulfato.  
Fonte: Madigan *et al.* (2010).

Na figura 3.3, PPi 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 fosfossulfato). 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<sub>2</sub>, 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 3.3, 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 fosfossulfato (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).

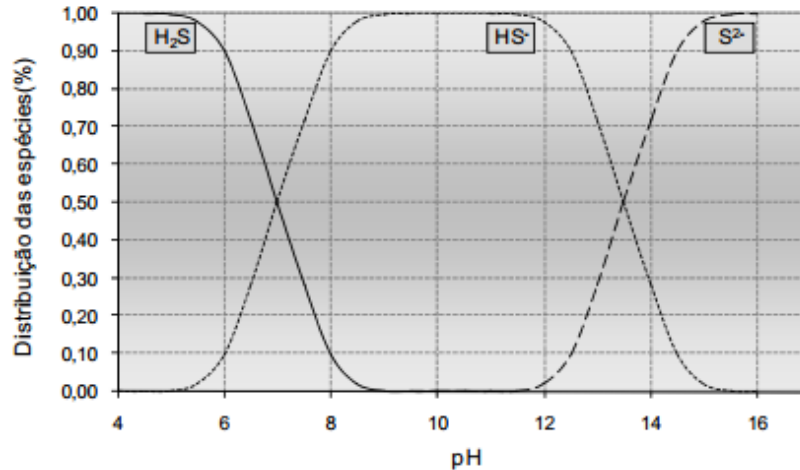
### **3.3 Características do íon sulfeto**

De acordo com Browker *et al.* (1989), o H<sub>2</sub>S 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<sub>4</sub><sup>2-</sup>) e está distribuído nas formas S<sup>2-</sup>, HS<sup>-</sup> (formas ionizadas), H<sub>2</sub>S (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 3.1 (LENS *et al.*, 1998):



Esta distribuição ocorre em função do pH (figura 3.4). Com o pH próximo de 7,0 pode estar na forma dissolvida (H<sub>2</sub>S) e/ou na forma dissociada (HS<sup>-</sup>) (YANG *et al.*, 2005). Contudo, o equilíbrio químico de H<sub>2</sub>S e HS<sup>-</sup> pode ser alterado quando ocorrem pequenas variações de pH na faixa entre 6,0 e 8,0. A figura 3.4 também mostra que a forma S<sup>2-</sup> é mais estável em pH alcalino e que, na faixa de 7,5 a 9,0, as concentrações de H<sub>2</sub>S representam menos de 20% do sulfeto total.



**Figura 3-4:** Distribuição percentual das espécies de sulfeto em meio aquoso para diferentes valores de pH, para a temperatura de 25°C.

Fonte: CHERNICHARO (2007).

Além das fontes antropogênicas de emissão de sulfeto ligadas a descartes industriais, o sulfeto é liberado em efluentes de reatores anaeróbios, quando aplicados ao tratamento de águas residuárias contendo sulfato. O sulfeto produzido em reator anaeróbio é distribuído entre S<sup>2-</sup>, HS<sup>-</sup> e H<sub>2</sub>S<sub>aq</sub> em solução, H<sub>2</sub>S no biogás e sulfetos metálicos insolúveis de acordo com equilíbrio químico e físico (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; seus efeitos nocivos serão descritos detalhadamente a seguir.

### 3.4 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<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Para esgotos domésticos, a principal fonte de enxofre é o SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> na concentração de 40-200 mg/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 BRS.

De acordo com estudo realizado por Noyola *et al.* (2006), as concentrações de H<sub>2</sub>S presente no biogás de reatores anaeróbios tratando esgotos domésticos variam de 10 a 820 ppm e podem atingir 1000 ppm em digestores anaeróbios de lodo.

Segundo Souza (2006), a concentração média de sulfeto de hidrogênio dissolvido, no efluente de um reator UASB tratando esgotos domésticos, é de aproximadamente 10 mgS/L<sup>-1</sup>. Estudos

realizados por Visser *et al.* (1995) e Speece (1996) sugeriram que reatores UASB podem tolerar entre 170 e 200 mg H<sub>2</sub>S/L. Acima desta concentração, o sulfeto dissolvido pode ser despreendido do efluente dos reatores UASB para a atmosfera e problemas relacionados à sua corrosão, toxicidade, demanda de oxigênio, e mau odor podem ocorrer.

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 oxidação do ferro, o que gera a corrosão deste. Além disso, a formação de sulfetos de cobre (CuS e Cu<sub>2</sub>S) 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 0,5 mg /L, já a corrosão severa pode ocorrer com 2,0 mg/L (ZHANG *et al.*, 2008).

Outra desvantagem do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) 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 microrganismos (OUDE EFERINK *et al.*, 1994).

Em condições anaeróbias, as BRS utilizam o sulfato como acceptor 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. Este processo resulta em baixo rendimento na produção de metano e alteração na qualidade do biogás, já que parte do sulfeto produzido termina como H<sub>2</sub>S no biogás (OUDE EFERINK *et al.*, 1994).

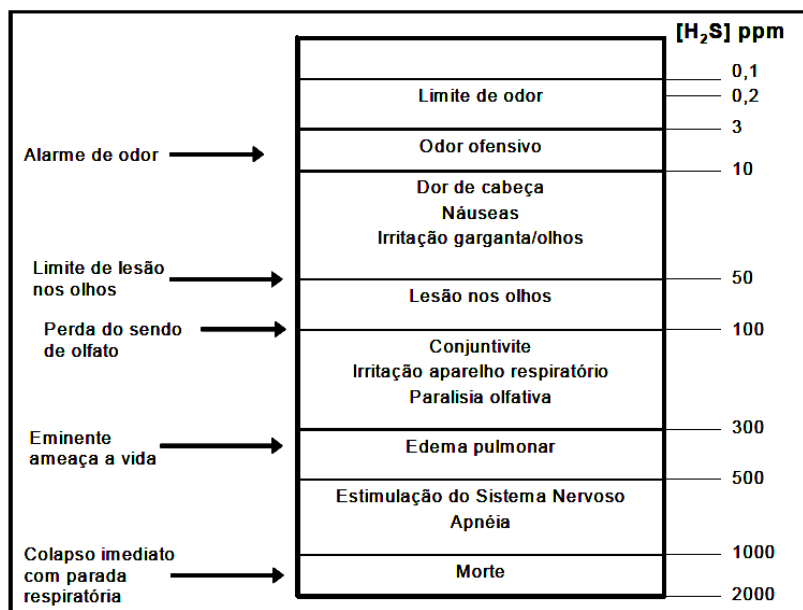
Em contrapartida, o sulfeto presente no efluente do reator anaeróbio resulta em diminuição da eficiência global de tratamento do sistema, com o sulfeto contribuindo também para a DQO das águas residuárias, já que são requeridos dois moles de oxigênio por mol de sulfeto oxidado completamente a sulfato.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

As principais desvantagens da presença do sulfeto em reatores anaeróbios estão listadas na tabela 3.1, adaptado de Hulshoff-pol *et al.* (1998).

**Tabela 3-1: Efeitos da formação de sulfeto em reatores anaeróbios.**

Desvantagens	Vantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução na eficiência de remoção da DQO devido a presença de H<sub>2</sub>S no efluente                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corrosão</li> </ul> </li> <li>• Acúmulo de material inerte no lodo (sulfetos metálicos)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor formação de metano</li> </ul> </li> <li>• Baixa qualidade do biogás + necessidade de remoção do sulfeto do biogás                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mau odor</li> <li>• Toxicidade</li> </ul> </li> <li>• Deterioração de sistema de pós-tratamento ("bulking" de lodo ativado; excessivo crescimento de microrganismos filamentosos)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remoção de compostos de enxofre oxidado (sulfato, sulfeto e tiosulfato)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Remoção de metais pesados</li> </ul> </li> <li>• Precipitação de sulfetos metálicos (FeS); nesta forma é um bom precursor para granulação</li> </ul>

Conforme mostra a figura 3.5, 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 apneia (JENSEN *et al.*, 1995).



**Figura 3-5: 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 H<sub>2</sub>S na concentração de 300ppm 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).

### **3.5 Processos químicos e biológicos para remoção de sulfeto em águas residuárias**

Algumas estratégias para minimizar o problema de toxicidade causada pelo 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  $\text{HS}^-$ , 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, 2007).

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. Outros métodos considerados convenientes para remoção de sulfeto são: precipitação com íons metálicos e o *stripping* do  $\text{H}_2\text{S}$  (LENS *et al.*, 1998).

Dentre as desvantagens provenientes desses processos 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 ( $>850^\circ\text{C}$ ) (MANZ, 1992).

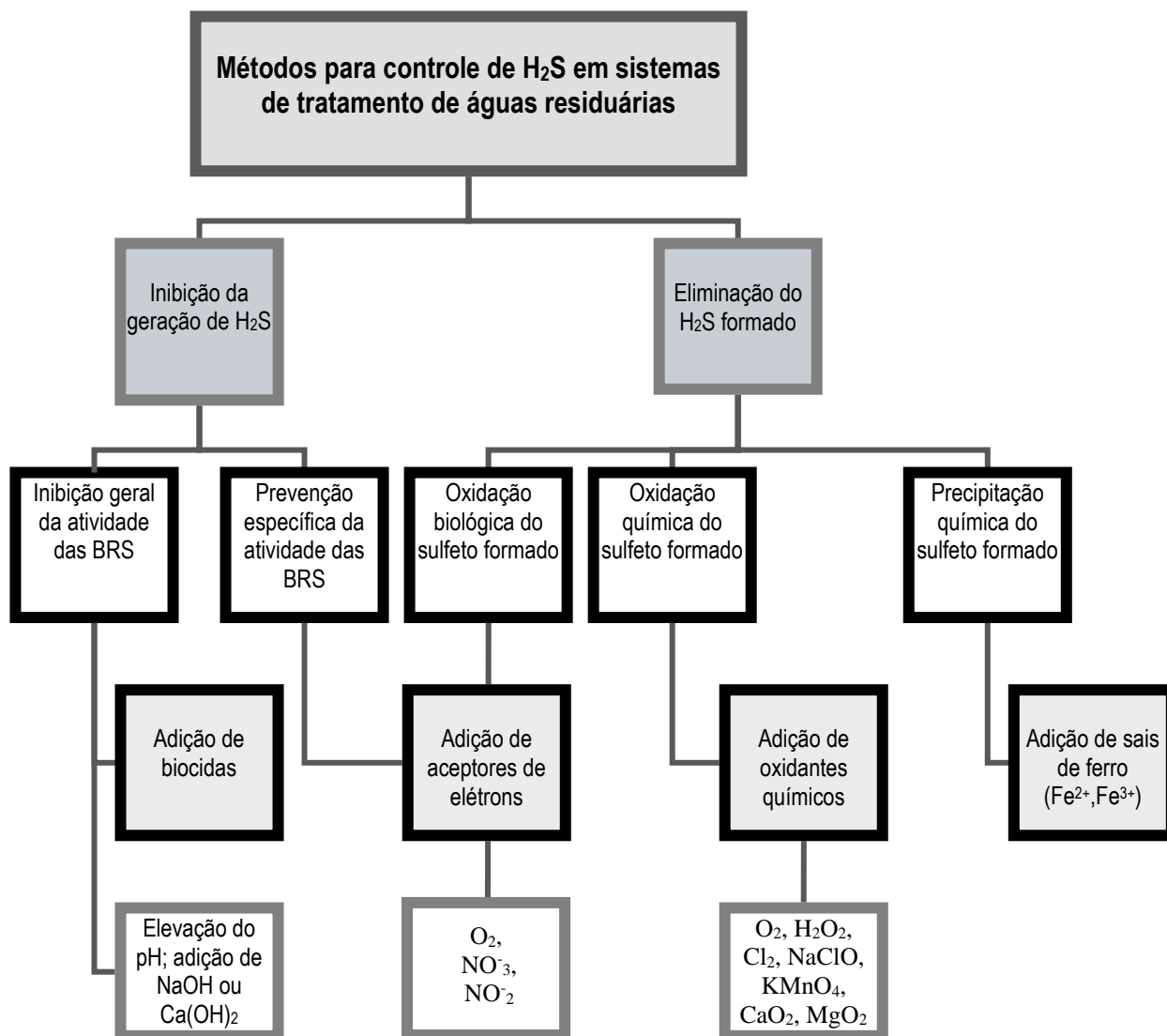
Em contrapartida, os processos biológicos oferecem vantagens operacionais pois operam em temperatura ambiente e sob pressão atmosférica sendo, portanto, uma alternativa de baixo custo e de elevada eficiência para eliminação do  $\text{H}_2\text{S}$ , onde sua concentração pode permanecer menor que 1mg/L no efluente (HENSHAW *et al.*, 1999).

Os processos biológicos podem ser aeróbios ou anaeróbios, onde ambos utilizam sulfobactérias. O processo anaeróbio é vantajoso, devido a simplicidade operacional e baixo custo. A oxidação biológica de sulfeto pode ser parcial a enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ), ou completa a sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ), sendo que a oxidação biológica pode ocorrer mesmo quando o  $\text{H}_2\text{S}$  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 3.6 apresenta as principais tecnologias químicas e biológicas para controle de emissão de sulfeto em sistemas de tratamento de esgotos. Duas alternativas podem ser seguidas: inibir o processo de geração de sulfetos ou remover o sulfeto formado por processos de oxidação ou precipitação.



**Figura 3-6:** Processos químicos e biológicos para controle da emissão de H<sub>2</sub>S.  
 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 - 43°C e pH abaixo de 5,5 ou acima de 9,0. No entanto, esta inibição 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).

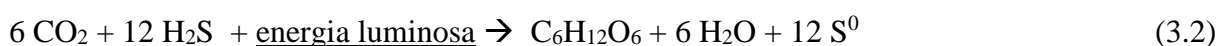
Os processos biológicos são muitas vezes considerados como uma alternativa de baixo custo e de elevada eficiência para eliminação do sulfeto, visto que, uma ampla variedade de microrganismos é capaz de oxidar e reduzir espécies de enxofre (ELSHAHED *et al.*, 2003). A biodessulfurização, processo no qual se utilizam microrganismos capazes de oxidar compostos reduzidos de enxofre transformando-os em compostos de fácil eliminação, possui uma série de vantagens como baixo custo de operação e menor consumo energético, além de poder ser operado a temperatura ambiente (PÉREZ e VILLA, 2004).

### **3.6 Oxidação biológica de sulfeto**

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 microbiana. Ampla variedade de microrganismos 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).

A oxidação biológica do sulfeto pode ocorrer em condições aeróbias, anóxicas ou anaeróbias, com oxigênio, nitrato ou dióxido de carbono atuando, respectivamente, como aceptores de elétrons. Janssen *et al.* (1999) fizeram referência a 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 conforme apresentado na equação 3.2, 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 3.3) que usa a água como doador de elétrons para produzir oxigênio, essas bactérias usam o H<sub>2</sub>S como doador de elétrons, oxidando-o inicialmente a S<sup>0</sup> e, posteriormente, a SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (FRIEDRICH *et al.*, 2005).



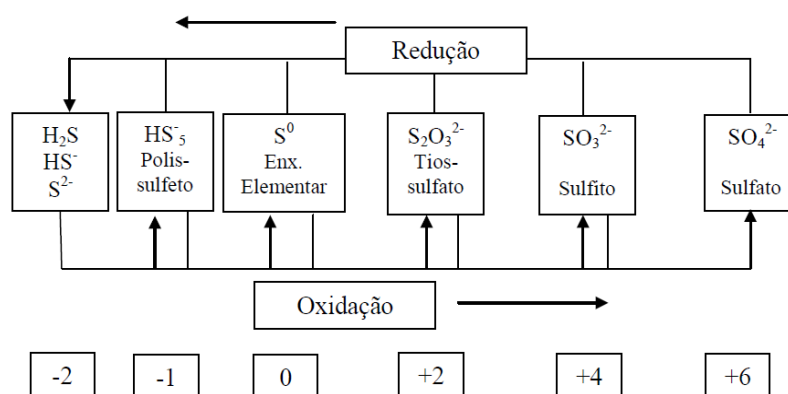
O segundo processo proposto por Janssen *et al.* (1999) pode ser descrito pelas reações 3.4, 3.5 e 3.6 na tabela 3.2. Este processo é realizado por bactérias quimiolitotróficas e ocorre em condições aeróbias. Segundo Madigan *et al.* (2010), estas bactérias obtêm sua energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos e a síntese de ATP está ligada à oxidação do doador de elétrons. Neste processo, o oxigênio molecular é oceptor 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)

**Tabela 3-2:** Reações de oxidação de sulfeto por sulfobactérias quimiolitotróficas.

Reação de oxidação	$\Delta G^\circ$ (KJ/reação)
(3.4) $\text{H}_2\text{S} + 2 \text{ O}_2 \rightarrow \text{SO}_4^{-2} + 2\text{H}^+$	- 798,2
(3.5) $\text{H}_2\text{S} + 1/2\text{O}_2 \rightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$	- 209,4
(3.6) $\text{S}^0 + 3/2 \text{ O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{-2} + 2\text{H}^+$	- 587,1

Dentre os compostos sulfurados utilizados como doadores de elétrons estão principalmente o sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) e enxofre elementar ( $\text{S}^0$ ). Todavia, em condições anaeróbicas, algumas bactérias oxidadoras de sulfeto podem crescer na presença de tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), 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 3.7) quando os compostos são oxidados a  $\text{SO}_4^{2-}$ , sendo este, portanto, o produto preferencial.



**Figura 3-7:** 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 ( $<0,1\text{mg/L}$ ). 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, por exemplo, 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  $47^\circ\text{C}$ , acima destas condições o  $\text{S}^0$  desproporciona, formando sulfeto e sulfito (JANSSEN *et al.*, 1999).

Janssen *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 o diâmetro de 1 µm, forma esférica ou elipsoidal, podem 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 microrganismos (ELSHAHED *et al.*, 2003).

Portanto, a oxidação parcial é induzida quando há interesse de recuperação do 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).

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).

### 3.6.1 Oxidação de sulfeto por sulfobactérias incolores

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

Estes microrganismos apresentam diferentes formas, desde bacilos, espirais, 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 quimiolito-heterotróficas (*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 3.5), 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 *Thiotrix* ser considerada um problema em sistemas como lodos ativados (pois estão diretamente relacionadas ao *bulking* filamentososo 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<sub>2</sub>, oxidam H<sub>2</sub>S a S<sup>0</sup> ou HS<sup>-</sup> a S<sup>0</sup>, 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 H<sub>2</sub>S a S<sup>0</sup> aumenta o pH, enquanto a oxidação de S<sup>0</sup> a SO<sup>-2</sup><sub>4</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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 identificação destas cepas (STAL, 1995).

Janssen *et al.* (1999) reportaram que os microrganismos 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.

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 (que é o acceptor final de elétrons usado na oxidação do

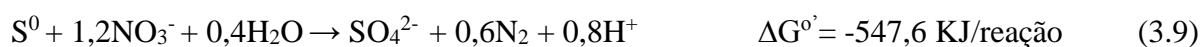
H<sub>2</sub>S) (TANG *et al.*, 2009). Este processo é denominado desnitrificação autotrófica, onde as bactérias quimiolitotróficas são capazes de oxidar compostos inorgânicos reduzidos de enxofre, como sulfetos (S<sup>2-</sup>), enxofre elementar (S<sup>0</sup>), tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), ou sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), 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 também 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* 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 3.7 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 3.8.



Também é possível ocorrer a desnitrificação com a oxidação de enxofre elementar a sulfato como representa a reação abaixo (equação 3.9), esta rota ocasiona consumo da alcalinidade, ao contrário da rota onde 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 microrganismo apresentou velocidade máxima específica de crescimento de 0,63h, com tempo de duplicação de 1h. A velocidade de redução de nitrato ficou em torno de 0,05g de N.gSSV.h.



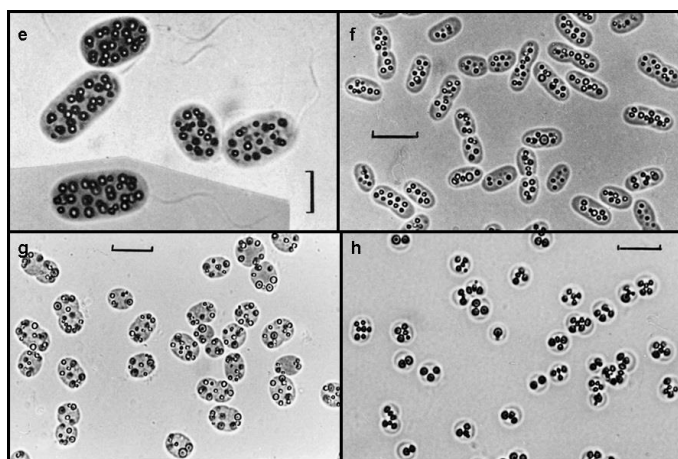
### 3.6.2 Oxidação de sulfeto por sulfobactérias verdes e púrpuras

As bactérias fototróficas correspondem a um grande grupo de microrganismos metabolicamente diversos, agrupados em função da utilização de sulfeto e da pigmentação característica. 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 anoxigênicas são divididas em seis famílias, incluídas nas ordens *Rhodospirillales* e *Chlorobiales*. 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 microrganismos 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 sulfobactérias púrpuras reportados na literatura são *Chromatium*, *Thioalkalicoccus*, *Thiorhodococcus*, *Thiocapsa*, *Thiocystis*, *Thiococcus*, *Thiospirillum*, *Thiodictyon*, *Thiopedia*, *Ectothiohodospira*, *Thiorhodospira* e *Halorhodospira*. Embora, a luz seja a principal fonte de energia destes microrganismos, 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* e *Chloroherpeton* (TANG *et al.*, 2009).

Em condições anóxicas, e incidência de luz, todas as espécies dessa família são capazes de crescer fotolitoautotróficamente com sulfeto ou  $S^0$  como doador de elétrons. Como mostra a figura 3.8, os glóbulos de  $S^0$  se acumulam como um produto de oxidação intermediária no interior das células (BRENNER *et al.* 2005a).



**Figura 3-8:** (e-h) Gêneros da família *Chromatiaceae*, com detalhe para a morfologia semelhante e diferente distribuição dos grânulos intracelulares de enxofre. Legenda: (e) *Chromatium okenii*; (f) *Allochromatium vinosum*; (g) *Thiocystis violacea*; (h) *Thiocystis gelatinosa*. Escala: 5µm. Fonte: BRENNER 2005a.

Conforme Holt e John (1994), as sulfobactérias fototróficas apresentam diferentes morfologias tais como células esféricas, espiraladas, 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 morfológicamente 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 microrganismos 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 microrganismos, 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 contêm grande quantidade de matéria orgânica em decomposição e se adaptam principalmente a ambientes neutrofílicos e mesofílicos. Além disso, são extremamente adaptadas a flutuações óxica-anóxicas, gradientes de sulfeto-oxigênio e flutuações diurno-noturno (ELSHAHED *et al.*, 2003).

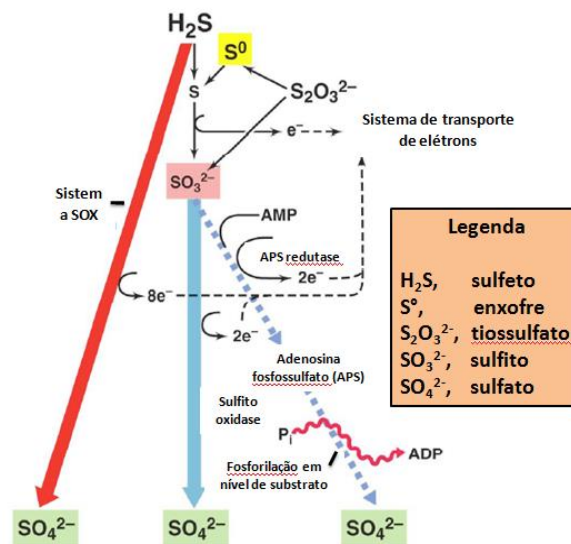
As bactérias fototróficas púrpuras e verdes também são encontradas em lagos ricos em sulfeto, lagoas poluídas por esgoto e em águas termais. Nos lagos, esses microrganismos podem apresentar densidades extremamente altas, sob condições ambientais favoráveis que incluem quantidade suficiente de luz na 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).

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 tornou mais eficientes no consumo do sulfeto acumulado na camada anóxica do sedimento do que as bactérias incolores (JØRGENSEN e DES MARAIS, 1986).

### **3.6.3 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 do enxofre, em dois sistemas o substrato inicial H<sub>2</sub>S, tiosulfato e enxofre elementar devem ser primeiramente reduzidos a sulfito (SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>), partindo-se do sulfeto, 6 elétrons são liberados e posteriormente, o sulfito é oxidado a sulfato.

O sistema mais amplamente difundido é aquele que utiliza a enzima sulfito oxidase, esta enzima transfere os elétrons do  $\text{SO}_3^{2-}$  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  $\text{SO}_3^{2-}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$  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  $\text{SO}_4^{2-}$ , 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 3.9. Quando o tiosulfato atua como doador de elétrons, o mesmo é inicialmente clivado em  $\text{S}^0$  e  $\text{SO}_3^{2-}$ , os quais podem ser eventualmente oxidados a  $\text{SO}_4^{2-}$  (MADIGAN *et al.*, 2010).

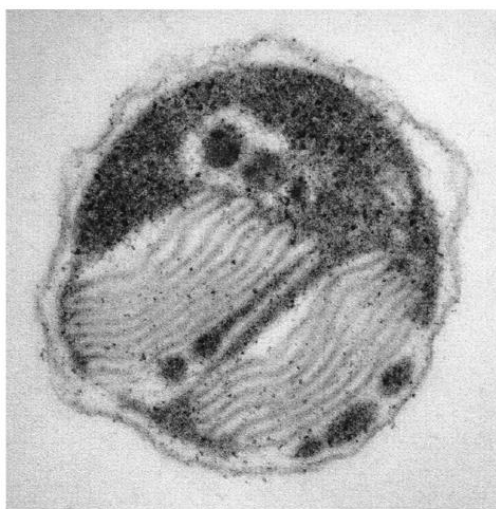


**Figura 3-9:** Bioquímica da oxidação de sulfeto por bactérias quimiolitotróficas.  
 Fonte: Madigan *et al.* (2010).

O sistema enzimático de oxidação de enxofre (SOX), sulfito desidrogenase (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  $\text{HS}^-$  a  $\text{S}^0$  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  $\text{S}^0$  a  $\text{SO}_4^{2-}$  procede via redutase sulfito dissimilatória reversa e sulfito desidrogenase.

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

Em relação as sulfobactérias púrpuras, para que as mesmas cresçam autotroficamente a síntese de ATP não é suficiente. Um poder redutor (NADH) é necessário, de modo que o CO<sub>2</sub> possa ser reduzido, o poder redutor de sulfobactérias púrpuras origina-se com o H<sub>2</sub>S, embora S<sup>0</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> e mesmo Fe<sup>2+</sup> ou NO<sup>2-</sup> possam ser utilizados por várias espécies. Quando o H<sub>2</sub>S corresponde ao doador de elétrons, glóbulos de S<sup>0</sup> são armazenados no interior das células. Substâncias reduzidas como H<sub>2</sub>S, são oxidadas por citocromos do tipo *c*, sendo os elétrons eventualmente transferidos ao “pool de quinonas” da membrana fotossintética (figura 3.10). No entanto, o *E*<sub>0</sub>' da quinona (cerca de 0 volts) é insuficientemente eletronegativo para reduzir diretamente o NAD<sup>+</sup> (-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<sup>+</sup> a NADH. Esse processo, que requer energia, é denominado transporte reverso de elétrons, sendo dirigido pela energia da força próton motiva.



**Figura 3-10:** Membrana fotossintética em sulfobactérias púrpuras.

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

O ciclo do ácido cítrico reverso é o mecanismo de fixação de CO<sub>2</sub> em bactérias verdes sulfurosas. Em *Chlorobium*, por exemplo, a ferredoxina é gerada a partir de reações dirigidas pela luz. Partindo do oxalacetato, cada ciclo completado resulta na incorporação de três

moléculas de CO<sub>2</sub>, originando piruvato como produto. A clivagem do citrato, pela enzima ATP-dependente citrato liase, regenera o acceptor C<sub>4</sub> oxalacetato, e produz acetil-CoA, utilizado na biossíntese.

A conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato consome o equivalente a duas ligações fosfato ricas em energia. O NADH ou FADH suprem o poder redutor adicional necessário ao ciclo. Estudos dos processos de transferência de energia em bactérias verdes sulfurosas mostraram que a energia luminosa absorvida pelas bacterioclorofilas *c*, *d* nos clorossomos é direcionada à bacterioclorofila *a*, localizada na sua membrana citoplasmática. Nesse local ocorre a conversão fotossintética de energia e a síntese de ATP (MADIGAN *et al.*, 2010).

### **3.7 Oxidação biológica e química do enxofre elementar**

Esta oxidação é realizada principalmente por ácidobacilos aeróbios (equação 3.10), gram-negativos, não formadores de esporos (*Acidithiobacillus thiooxidans*, anteriormente denominado, *Thiobacillus thiooxidans*), que crescem a 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 microrganismos se desenvolvem pela oxidação do ferro ferroso, compostos reduzidos de enxofre inorgânico ou minérios de sulfeto (FRIEDRICH, 2005 ).

Alguns microrganismos 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 & Revah (2007) descreveram alguns fatores que podem influenciar a estequiometria e cinética da oxidação química, 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 seguem nas equações 3.11 a 3.14, 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 microrganismos oxidarem sulfeto a tiosulfato. Além disso, segundo os referidos autores, a formação de tiosulfato é favorecida com o aumento do pH (acima de 8,5).

Van den Ende & 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.

### **3.8 Investigação da diversidade microbiana por meio de técnicas moleculares**

Tradicionalmente, a detecção e a identificação de bactérias eram feitas por meio de observação direta através do microscópio e isolamento e cultivo em meio específico. No entanto, a utilização dessas metodologias fornecia informações limitadas em relação a

diversidade de microrganismos presentes em uma amostra, já que somente eram identificadas os organismos dominantes ou capazes de crescerem no meio de cultura específico. A partir da década de 90 com o desenvolvimento da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase), os estudos da diversidade de microrganismos em amostras tanto ambientais quanto provenientes de sistemas de engenharia, passaram a empregar as técnicas de biologia molecular que se baseiam na amplificação, clonagem e sequenciamento de uma molécula marcadora que é o gene que codifica o RNAr 16S. O RNAr 16S é um importante marcador filogenético por sua distribuição universal (está presente em todos os procariotos), sua conservação estrutural e funcional, apresentando regiões tanto conservadas ao longo da evolução quanto regiões variáveis em diferentes porções da molécula, e por seu tamanho (cerca de 1500 pares de base) que fornece informação sobre a sequência de bases, suficiente para inferências filogenéticas (MUYZER *et al.*, 1993).

A PCR é o método básico usado para se obter cópias de segmentos de DNA genômico para clonagem e sequenciamento de genes utilizados na caracterização e identificação de microrganismos. A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) permite a separação de fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com sequências de nucleotídeos diferentes, baseada na mobilidade eletroforética de uma molécula de DNA parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida contendo gradiente crescente de agentes desnaturantes (uréia e formamida). A dissociação da dupla fita de DNA ocorre no “domínio de dissociação”, quando há a desnaturação dos pares de base devido ao aumento da concentração do desnaturante. Uma vez no domínio de dissociação, ocorre a transição de forma helicoidal do DNA para a forma de um fragmento parcialmente dissociado. Os fragmentos de DNA com sequências diferentes irão parar de migrar em diferentes posições no gel, sendo assim, separados (ROSADO, 2002).

Segundo Rosado e Duarte (2002), dentre as vantagens da técnica de DGGE pode-se citar: a técnica permite ter uma ideia geral das espécies predominantes no ecossistema que se está estudando em pouco tempo; é adequada para analisar um grande número de amostras quando comparada com outras técnicas tal como a clonagem; pode-se realizar o sequenciamento de bandas isoladas do gel. No que se refere as limitações desta técnica, pode-se citar problemas na amplificação de DNA representativo das populações presentes na amostra. Além disso, genes excepcionalmente ricos em GC não são facilmente analisados, pois é muito difícil separar as bandas no gel.



O uso combinado das técnicas moleculares de PCR-DGGE tem sido bastante aplicado para avaliar a diversidade microbiana em reatores (MUYZER *et al.*, 1993; ACHENBACH *et al.*, 2001; MANSKE *et al.*, 2005; RAMOS *et al.*, 2013 ; RAMOS *et al.*, 2014).

Muyzer *et al.* (1993) analisaram a diversidade genética de populações microbianas complexas com PCR-DGGE. Utilizaram microrganismos de duas origens: sedimento marinho e biofilme bacteriano proveniente de reatores de tratamento de águas residuárias aeróbios e anaeróbios fornecidos pela Delft University of Technology, The Netherlands. Aplicaram o DGGE para analisar os fragmentos derivados da região variável V3 do gene RNAr 16S. Esses fragmentos foram obtidos após da amplificação dos genes do RNAr 16S provenientes do DNA genômico de cultura mista de microrganismos. Os resultados deste estudo mostraram a presença das espécies: *Escherichia coli*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Microcoleus chthonoplastes* e *Thiobacillus thioparus*.

No trabalho de Casamayor *et al.* (2000) foram coletadas amostras do tapete microbiano de dois lagos no nordeste da Espanha, as sequencias obtidas no DGGE corresponderam a bactéria verde sulfurosa semelhante a *Chlorobium* e as bactérias púrpuras sulfurosas semelhantes a *Amoebobacter*, *Thiocystis* e *Chromatium*. Além disso, a análise filogenética indicou que diferentes bactérias e linhagens de arqueias estiveram presentes. Dentre as arqueias, foram encontradas espécies metanogênicas e termofílicas relacionadas a *Euryarchaeota* e *Crenarchaeota*, respectivamente.

Ramos *et al.* (2013) caracterizaram a diversidade de uma comunidade bacteriana de um digestor piloto, com o objetivo de tratar o biogás pela remoção de H<sub>2</sub>S. Durante a pesquisa de 128 dias, a eficiência média de remoção foi de 94%. A análise microbiológica confirmou a presença de pelo menos três gêneros de bactérias oxidadoras de sulfeto, sendo *Proteobacteria* o filo predominante dentro do sistema, com os gêneros *Acinetobacter*, *Arcobacter* e *Sulfuricurvum* como representantes e capazes de promover a oxidação do sulfeto neste sistema.

O Biogás produzido em um reator de lodo de esgoto em escala piloto (5m<sup>3</sup>) foi tratado de modo a remover o sulfeto sob condições de micro aeração. Neste trabalho, Ramos *et al.* (2014), através dos resultados obtidos pela técnica do DGGE, perceberam que a maior taxa de transferência de O<sub>2</sub> no lodo, mantida no biogás para recirculação aumentou a riqueza microbiana, causando uma mudança importante na estrutura das comunidades a longo prazo.

Todos os gêneros identificados (*Methanosaeta*, *Methanospirillum* e *Methanoculleus*) estavam presentes tanto sob condições anaeróbias quanto microaeróbias.

Em função das vantagens da técnica de PCR-DGGE já descritas anteriormente e do fato de ser largamente empregada na literatura para avaliar a estrutura e dinâmica de comunidades microbianas presentes em diferentes sistemas, esta foi a técnica escolhida no presente trabalho para avaliar a comunidade bacteriana formada nos reatores de oxidação de sulfeto.

O DGGE é uma técnica muito apropriada não somente para caracterizar comunidades complexas, como monitorar bactérias a partir de amostras ambientais e acompanhar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema. Nesse sentido, este trabalho utilizou a técnica de DGGE para avaliar a diversidade de bactérias presente na biomassa aderida em materiais suportes diferentes de reatores removendo sulfeto.

### **3.9 Reatores utilizados no processo de oxidação biológica de sulfeto**

Diante das diferentes rotas metabólicas apresentadas pelas sulfobactérias, é difundido na literatura o uso tanto das sulfobactérias incolores quanto das fototróficas anoxigênicas na remoção de sulfeto em reatores em escala de bancada.

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  $0,107 \text{ kgS}^2/\text{m}^3.\text{d}$ , 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  $0,0362 \text{ kgS}^2/\text{m}^3.\text{d}$ , 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* sp. 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, sendo que 74% correspondiam à forma elementar ( $S^0$ ) e o restante estava combinado com outros elementos, principalmente, sódio. A biomassa foi considerada adaptada, a medida que o sulfato foi sendo reduzido e a quantidade de sulfeto aumentando no efluente.

Kleinjan *et al.* (2003) sugeriram que as biotecnologias de remoção de sulfeto devem usar preferencialmente os microrganismos 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  $0,0016 \text{ kgS}^2\text{-/m}^3\text{.d}$  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 ( $0,1\text{mg/L} - 0,5\text{mg/L}$ ) para promover a oxidação parcial de sulfeto a enxofre por microrganismos. 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  $19\text{kgS}^2/\text{m}^3\cdot\text{d}$ , 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  $-400\text{mV}$  e  $-350\text{mV}$ , similar ao observado por Janssen *et al.* (1998) que obtiveram máxima recuperação de enxofre com potencial redox entre  $-147\text{ mV}$  e  $-137\text{mV}$ .

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 ( $0,15\text{ mg/L}$ ). 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  $4,0\text{kgS}^2/\text{m}^3\cdot\text{d}$ , 90% de enxofre elementar foi produzido no reator.

Em relação a remoção de sulfeto presente no biogás, os microrganismos 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  $\text{H}_2\text{S}$  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  $0,450\text{ kgS}^2/\text{L}\cdot\text{d}$  e  $0,450\text{ kgNO}_3^-/\text{L}\cdot\text{d}$  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 microrganismos responsáveis pela oxidação anaeróbia do sulfeto na presença de nitrato (ZHANG *et al.*, 2008).

Ramos *et al.* (2013) investigaram a viabilidade de dessulfuração do biogás em uma unidade de microaeração separada do digestor, com biogás proveniente da digestão anaeróbia do lodo de uma estação de tratamento de esgotos. Foi concluído nesse trabalho uma alta eficiência de remoção (94%) e resistência às variações na carga de  $\text{H}_2\text{S}$  (de 0.22 a 0.35%v/v), além de haver vantagens tais como menores requisitos de área, custos reduzidos e riscos de colmatação praticamente inexistentes. Entre as diversas possíveis configurações de sistemas de dessulfuração biológica do biogás, a microaeração é uma alternativa promissora. O processo consiste na introdução controlada de ar atmosférico ou gás oxigênio de forma a

promover a oxidação biológica do  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{S}^0$  ou  $\text{SO}_4^{2-}$ , dependendo da disponibilidade de  $\text{O}_2$ , por sulfobactérias incolores (RAMOS *et al.* 2014).

Atualmente, há processos patenteados pela PAQUES tal como o THIOPAC que promove a remoção de sulfato e de metais pesados do efluente combinando processo anaeróbio (que produz  $\text{H}_2\text{S}$  pela ação das bactérias redutoras de sulfato), em um reator, e oxidação biológica de sulfeto a enxofre elementar (em outro reator) por uma sulfobactéria incolor - *Thiobacillus* sp. Entretanto, ambos os processos apresentam elevado custo para implantação (Muyzer *et al.*, 1993).

Diante das vantagens da utilização de sulfobactérias para remoção de sulfeto, um estudo em escala de bancada realizado por Garcia *et al.*, 2012 foi conduzido com objetivo de verificar a possibilidade da presença das sulfobactérias na espuma de reatores UASB, com intuito de utilizá-la posteriormente na remoção de sulfeto do efluente de reatores UASB. Neste estudo, foi possível a identificação, por microscopia óptica, de bactérias envolvidas na oxidação de sulfeto tais como *Beggiatoa* e *Thiotrix*. Além disso, os testes em batelada realizados com a espuma demonstraram potencial de remoção biológica de sulfeto. Assim sendo, Garcia *et al.*, 2014, desenvolveram reatores para oxidação biológica de sulfeto com configuração semelhante ao decantador de reator UASB e sem inoculação de biomassa, permitindo que os micro-organismos presentes no próprio efluente se desenvolvessem ali.

A tabela 3.3 apresenta um resumo dos trabalhos citados na literatura referente a remoção de sulfeto. A principal limitação destes trabalhos é que poucos destes estudos quantificaram o enxofre elementar, ou seja, consideram a formação deste por meio de uma conversão no qual o sulfeto removido que não foi convertido a sulfato, é considerado enxofre elementar. Portanto, essa limitação dificulta a verificação da viabilidade técnica da recuperação de 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 biorreatores que propiciem a remoção de sulfeto e recuperação do enxofre elementar de efluentes que não sejam sintéticos, como é o caso do presente estudo.

Diante disso, o presente projeto de pesquisa apresenta-se inovador devido a sua proposta de operar biorreatores projetados tanto para remover sulfeto de hidrogênio, quanto para recuperar enxofre elementar do efluente de um reator UASB tratando esgotos domésticos. Além disso, considerando que uma das desvantagens do reator UASB é a emissão de  $H_2S$ , os biorreatores foram projetados de forma similar a um decantador secundário de reator UASB e uma vez que ocorra remoção de sulfeto utilizando espuma, uma nova alternativa econômica para configuração de decantadores pode ser utilizada para remoção de sulfeto de hidrogênio.

**Tabela 3-3:** 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 <sup>2-</sup> / m <sup>3</sup> .d )	Eficiência de remoção de sulfeto (%)	Recuperação de S <sup>o</sup> e/ou produção de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (%)	Referência
Reator anaeróbio com colunas	24	Biomassa suspensa ( <i>Chlorobium</i> e <i>Rhodospseudomonas</i> )	Não se aplica	0,107	95	95 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	Kobayashi <i>et al.</i> (1983)
Reator em batelada	24	Biomassa suspensa ( <i>Thiobacillus denitrificans</i> )	1,0	1,7	100	100 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) 75 (S <sup>o</sup> )	Janssen <i>et al.</i> (1995)
Biorreator anaeróbio em escala de bancada	24	Biomassa imobilizada ( <i>Chlorobium limicola</i> )	Não se aplica	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 <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) 80 (S <sup>o</sup> )	Krishnakumar <i>et al.</i> (2005)
Reator aeróbio em bateladas sequenciais	24	Biomassa imobilizada (espuma de poliuretano)	0,5	0,134	88	20 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) 68 (S <sup>o</sup> )	Silva <i>et al.</i> (2005)
Reator airlift	4	Biomassa suspensa (lodo ativado)	0,15	4,0	90	90 (S <sup>o</sup> )	Lohwacharin e Annachhatre, (2010)
Reator anaeróbio em batelada	24	Biomassa suspensa ( <i>Thiobacillus</i> sp.)	Não se aplica	0,450	100	100 (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	Fajardo <i>et al.</i> (2012)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aparato e procedimento experimental

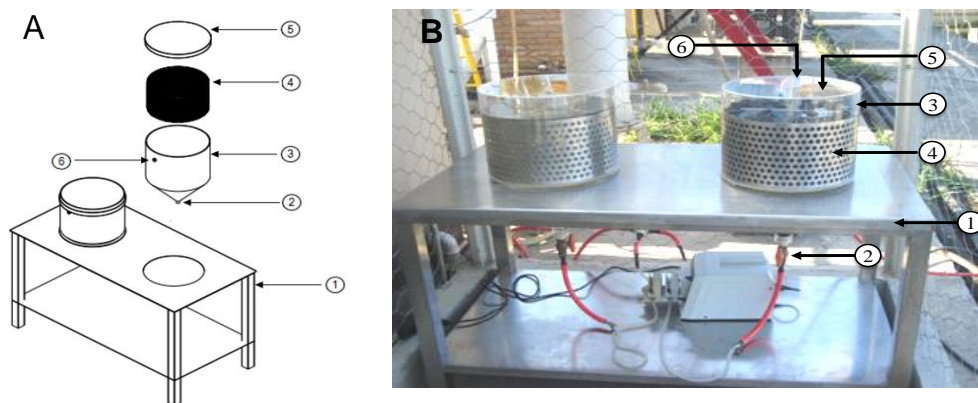
Neste estudo, o aparato experimental utilizado correspondeu a um reator UASB em escala piloto de fibra de vidro, com volume total de 340 L e dois reatores em acrílico e cobertura de acrílico, cada um com volume de 25 L, destinados à remoção de sulfeto dissolvido do efluente do reator UASB, tratando esgotos sanitários. Este trabalho esteve inserido no trabalho de doutorado intitulado “Estudo do desempenho e da comunidade microbiana de biorreator tratando efluente anaeróbio contendo sulfeto” da aluna Graziella Pereira Garcia.

Os três reatores estavam 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 4.1). 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 4.2 mostra o desenho esquemático dos reatores.



**Figura 4-1:** Foto do aparato experimental constituído pelo reator UASB em escala piloto e por dois reatores destinados a remoção biológica de sulfeto (R1 e R2) (GARCIA, 2014).



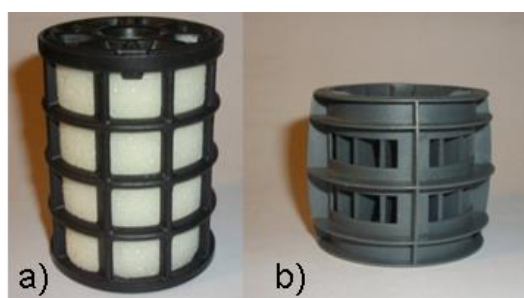


**Figura 4-2:** Desenho esquemático (a) e fotografia (b) do aparato experimental. Os componentes dos reatores estão numerados: (1) mesa suporte dos reatores, (2) entrada do afluente, (3) reator (4) cesto interno para preenchimento com material suporte (5) tampa transparente (6) saída do efluente (GARCIA, 2014).

As características dos materiais suportes utilizados estão descritas na tabela 4.1 e a imagens dos mesmos na figura 4.3.

**Tabela 4-1:** Características dos materiais suporte.

Material Suporte	Características
Biobob	Desenvolvido e cedido pela empresa Bio Proj Tecnologia Ambiental. Espuma de poliuretano envolta por estrutura rígida de polipropileno c/ 45 mm de diâmetro e 60 mm de altura.
Anel plástico	Polipropileno com 45mm de diâmetro e 35mm de altura.



**Figura 4-3:** Materiais suporte: a) Biobob®; b) anel plástico.

Na câmara cilíndrica dos reatores, havia um cesto interno (de aço inox) que foi preenchido com o material suporte. A utilização do material suporte objetivava aumentar a retenção de micro-organismos presentes naturalmente no efluente anaeróbico e com as perfurações do cesto ocorria à passagem do líquido para o interior do reator. Os reatores foram construídos com material transparente (acrílico) e tampados, a fim de proporcionar o crescimento de bactérias oxidadoras de sulfeto que crescem na presença de luz e em condições anaeróbicas.

O monitoramento dos reatores ocorreu durante 17 meses em três fases operacionais distintas, representadas por três tempos de detenção hidráulica (TDH), descritas na tabela 4.2:

**Tabela 4-2:** Fases operacionais e características dos reatores.

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

\*reator sem meio suporte

Na fase 1, o reator R1 foi comparado com o reator 2 sem meio suporte, denominado de R2 (controle), com intuito de verificar a diversidade microbiana entre os reatores (biomassa aderida- R1 e biomassa dispersa- R2) e verificar a influência do suporte na eficiência de remoção de sulfeto. Para a fase 2, os reatores foram desativados e uma nova partida foi realizada, o R1 foi novamente preenchido com anéis de polipropileno e o R2 foi preenchido com biobob. A fase 3 prosseguiu sem interrupção (em seguida a fase 2) com redução apenas do TDH de 12h para 6h. 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.

Os reatores não foram inoculados, a comunidade microbiana presente no próprio efluente anaeróbio se desenvolveu naturalmente dentro dos reatores durante o período de monitoramento. Os dois reatores foram operados em fluxo contínuo e alimentados com efluente anaeróbio contendo baixas concentrações de sulfeto dissolvido, cerca de 1 a 6 mg/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 e quinzenalmente. A coleta do afluente, nas três fases operacionais, foi realizada sempre no mesmo dispositivo de entrada, na qual a alimentação dos reatores era interrompida.

Já o efluente era coletado no ponto de saída dos reatores antes que a alimentação dos mesmos fosse interrompida. Tanto afluente e efluente eram coletados em frascos de 250 mL.

## 4.2 Análises físico-químicas

O monitoramento dos biorreatores foi realizado duas vezes por semana, sendo os parâmetros analisados: pH, potencial redox, sulfeto, sulfato, tiosulfato, e enxofre elementar, conforme apresentado na tabela 4.3.

**Tabela 4-3:** Parâmetros de análise, métodos analíticos, frequência e pontos de amostragem.

Parâmetro	Método	Pontos de amostragem	Frequência	Referência
pH e potencial redox	Potenciométrico	Interior do reator	Duas vezes por semana	APHA (2012)
Sulfeto ( $S^{2-}$ , $HS^-$ )	Iodométrico	Afluente e efluente		
Sulfato ( $SO_4^{2-}$ )	Turbidimétrico	Afluente e efluente		
Tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ )	Turbidimétrico	Afluente e efluente	Uma vez por semana	Henshaw et al. (1998)
Enxofre elementar ( $S^0$ )	Cromatografia líquida	Afluente e efluente		

Análises estatísticas foram realizadas para avaliar se as concentrações de sulfeto, sulfato e tiosulfato de determinadas amostras no afluente e efluente, eficiência de remoção sulfeto e concentrações de enxofre elementar diferiram significativamente. O teste de Kruskal-Wallis ( $\alpha = 5\%$ ) foi realizada, seguido por um teste de comparações múltiplas entre as medianas ( $\alpha = 5\%$ ), utilizando o software Statistica 8.

### 4.2.1 pH e potencial redox

O pH e potencial de oxido-redução foi medido em pHmetro (Modelo UB-10, Denver Instruments) com eletrodo combinado de platina com referência Ag/AgCl (Modelo DMR-CP1, Digimed).

### 4.2.2 Sulfeto

Na determinação da concentração de sulfeto dissolvido, o método utilizado foi o iodométrico e foi feito com amostras em triplicata. Entretanto, a menos que a amostra esteja inteiramente

livre de sólidos suspensos, o sulfeto dissolvido é igual ao sulfeto total. Dessa forma, para medir a concentração do sulfeto dissolvido, foi necessário remover a matéria insolúvel, segundo APHA (2012).

O referido método determina que a remoção da matéria insolúvel pode ser feita adicionando cloreto de alumínio, 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 6 N, o que conduziu a formação de um precipitado branco, sulfeto de zinco.

A equação 4.1 representa o processo descrito anteriormente, com a formação do precipitado sulfeto de zinco.



O tempo mínimo recomendado para a formação do precipitado é de trinta minutos, assim, depois de decorrido o tempo recomendado as amostras foram então submetidas à centrifugação por 30 s a 4000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um frasco erlenmeyer onde adicionou-se água, iodo 0,025 N, ácido clorídrico 6 N e amido. Em seguida, procedeu-se a titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,025 N.

Para determinação da concentração de sulfeto dissolvido nas amostras utilizou-se a equação 4.2.

$$\text{mg/L} = \frac{[(A.B) - (C.D)].1600}{\text{volume da amostra}} \quad (4.2)$$

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 foi medido o sulfeto gasoso, para isso, utilizou-se um medidor de H<sub>2</sub>S (OdaLog) na faixa de 0-200ppm.

### 4.2.3 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

$\text{SO}_4^{2-}$  em meio ácido acético com cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$ ), formando cristais uniformes de sulfato de bário ( $\text{BaSO}_4$ ) (equação 4.3). A absorvância da suspensão de  $\text{BaSO}_4$  foi medida com espectrofotômetro e a concentração de  $\text{SO}_4^{2-}$  determinada segundo uma curva padrão.



#### 4.2.4 Tiosulfato

Para realização da análise de tiosulfato foi coletado 50mL de amostra, em triplicata, sendo necessário a remoção de sólidos suspensos, esta etapa foi feita acrescentando à amostra, duas gotas de NaOH e duas gotas de  $\text{AlCl}_3$ , o preparo dessas soluções foi segundo APHA (2012). Posteriormente, foram transferidos 20 mL de amostra para um novo frasco e adicionou-se 0,5 mL de  $\text{NH}_4$  concentrada e 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , depois a amostra foi fervida para evaporação do excesso de  $\text{NH}_4$ . Após essa etapa, o tiosulfato foi convertido a sulfato e prosseguiu-se para mesma metodologia utilizada para análise de sulfato, conforme APHA (2012).

#### 4.2.5 Enxofre elementar

Especificamente o enxofre elementar foi extraído das amostras de biomassa e efluente dos reatores R1 e R2 em todas as fases operacionais, com  $\text{CHCl}_3$  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 quantificação de enxofre elementar nas amostras coletadas, antes da etapa de extração do  $\text{S}^\circ$  com clorofórmio, realizou-se o rompimento das células, conforme etapa de lise celular utilizado na metodologia de extração de DNA. Para isso, foram utilizados 2 mL de cada amostra, estas foram transferidas para um tubo de 2mL contendo 0,2 g de micropérolas de vidro e foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de tampão TEN, os tubos foram levados ao microdesmembrador e agitados por 1 minuto a 4000 rpm. Após agitação, o tubo era transferido para um banho de gelo e mantido por 1 minuto, com intuito de causar choque térmico nas células e rompimento das mesmas; esta operação foi repetida e após este procedimento, o enxofre elementar foi extraído das amostras.

### **4.3 Análises microbiológicas**

#### **4.3.1 Extração de DNA**

Para determinar a diversidade microbiana presente na biomassa dos reatores R1 e R2, nas diferentes fases operacionais (fase 1 - TDH=24 h, fase 2 - TDH=12 h e fase 3 - TDH=6 h), foi realizada a extração de DNA, seguida pela PCR-DGGE. Na etapa de extração de DNA, foram utilizados 2 mL de amostra do biofilme de cada reator, as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 10 minutos e após descarte do sobrenadante foi adicionado 1,0 mL de Tampão Fosfato (120 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 8,0), esse procedimento foi realizado novamente com as amostras e posteriormente, as alíquotas foram utilizadas 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 da solução de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% a 75 Volts por 45 minutos. Para avaliar o tamanho dos ácidos nucleicos 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.

#### **4.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**

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 4.4) que delimita a região universalmente conservada entre os micro-organismos do Domínio *Bactéria*, em 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°, 56° para anelamento e 72° para extensão (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 4-4:** 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]*ACGGGCGGTGTGTAC	337	56	Ferris <i>et al.</i> (1997)

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

Os reagentes necessários, as concentrações e o volume dos mesmos, para uma reação de PCR com volume final de 50 µL, estão apresentados na tabela 4.5. Todas as reações de PCR foram realizadas juntamente com um controle, ausente de amostra de DNA (branco), contendo somente os reagentes para a reação de PCR.

**Tabela 4-5:** 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 <sub>2</sub> )	<i>Phoneutria</i>	10X	1X	5 µL
dNTPs <sup>(1)</sup>	<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 <sup>(2)</sup>	<i>Sigma</i>	2,5mg/L	600ng	3,0µl
<i>Taq</i> polimerase	<i>Phoneutria</i>	5U/µL	0,025U/MI	0,25 µl
Amostra de DNA	-	-	-	3 µL

<sup>(1)</sup>dNTPs - nucleotídeos; <sup>(2)</sup> BSA - albumina de soro bovino.

Após a realização da PCR com o DNA obtido das amostras extraídas dos reatores, foram aplicado 2 µl dos produtos de PCR no gel de agarose 1% e 2 µL do marcador de peso molecular (*Low Mass Ladder* - Invitrogen), como padrão de referência para estimativa da concentração 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](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 400 ng 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% no caso das amostras das fases operacionais 1 e 2, gradiente desnaturante de 55% a 75% para as fases operacionais 2 e 3. O DGGE foi realizado nas seguintes condições: temperatura de 60 °C, 75 V, durante 16,5 horas no tampão TAE 0,5X (TAE 1X: 0,04 M Tris base; 0,02 M 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 2,0 mL contendo 50 µL de TE onde as bandas foram mantidas a 4°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 2 µL da banda que foi eluída em TE. Os produtos desta PCR foram purificados com etanol e o produto foi suspenso em 10 µL 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 24 h, 12 h e 6 h, 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 4.4 abaixo:

$$H = - \sum [n_i/N \log(n_i/N)] \quad (4.4)$$

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

### **4.3.3 Caracterização morfológica dos microrganismos presentes no biofilme dos reatores R1 e R2 em ambas as fases operacionais por microscopia óptica comum.**

As amostras do biofilme dos reatores R1 e R2 foram coletadas nas três fases operacionais estudadas, sendo que para os reatores com material suporte, a biomassa foi coletada de 10 anéis plásticos do reator R1 e 10 biobobs do reator R2, retirados de locais diferentes dentro dos reatores (superfície, laterais, meio e fundo). Na primeira fase experimental do reator R2, utilizado como controle (sem meio suporte), a biomassa também foi coletada de locais diferentes do reator e em quantidades equivalentes à do reator R1 com anel plástico.

A biomassa era desprendida cuidadosamente com a ajuda de uma pinça, observando as diferentes colorações e texturas da mesma, armazenada em tubo plástico, refrigerada e encaminhada ao laboratório. Cada amostra foi distribuída em duas lâminas de vidro com auxílio de uma pipeta de Pasteur e, por conseguinte, a lamínula. A leitura das lâminas era feita sempre no mesmo dia, duas horas após a coleta a fim de obter todas as características da biomassa.

A caracterização dos microrganismos foi feita por meio de microscopia óptica comum em microscópio binocular da marca Olympus, modelo BX-50, com câmara acoplada para captura de imagem. As amostras analisadas corresponderam aos dias 09/05/2013 referente a fase 1, 03/09/2013 referente a fase 2 e 29/04/2014 referente a fase 3 em ambos os reatores.

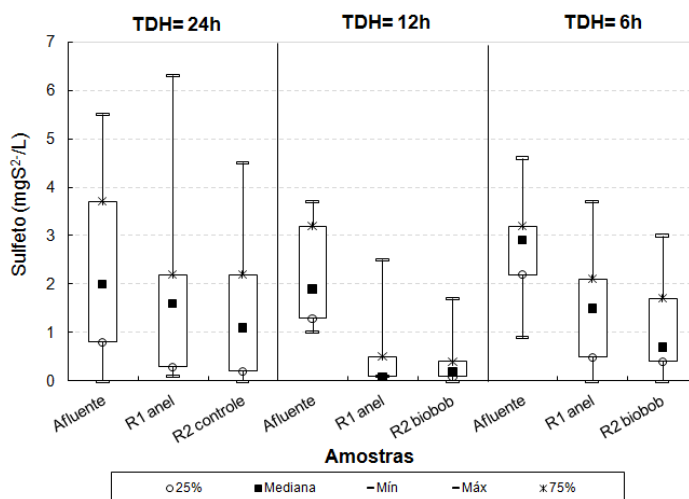
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desempenho dos reatores de oxidação biológica de sulfeto

#### 5.1.1 Monitoramento das concentrações de sulfeto, sulfato e enxofre elementar dos pontos afluente e efluente dos reatores

Os reatores foram monitorados durante 500 dias em três fases operacionais distintas representadas pelos seguintes tempos de detenção hidráulica: fase 1- TDH=24 h; fase 2- TDH=12 h; fase 3- TDH=6 h. Como a maioria dos resultados de monitoramento dos reatores (concentrações de sulfeto, sulfato, tiosulfato e enxofre elementar dos pontos afluente e efluente) foi apresentada no trabalho de Garcia (2014), serão mostrados no presente trabalho somente os dados de concentração e de eficiência de remoção de sulfeto de modo a poder correlacionar a eficiência do reator com a estrutura da comunidade bacteriana. Além disso, apresenta-se neste trabalho o balanço de massa de enxofre para os reatores R1 e R2 nas três fases operacionais (tabela 5.1). Os cálculos do balanço de massa de enxofre foram realizados a partir dos dados de Garcia (2014) e contaram com o auxílio fundamental do doutorando Emanuel Brandt e da Dra. Livia Lobato.

Os resultados das determinações de sulfeto (afluente e efluente) durante as três fases operacionais estão apresentadas na figura 5.1



**Figura 5-1:** Box-plot das concentrações de sulfeto (afluente e efluente) dos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais (Garcia, 2014).

As concentrações de sulfeto dissolvido no afluente dos reatores foram baixas, com valores medianos em torno de 2mg/L nos TDH de 24 h e 12 h, e 3 mg/L no TDH de 6 h. Com relação

as fases operacionais é possível observar que no TDH de 12 h 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.

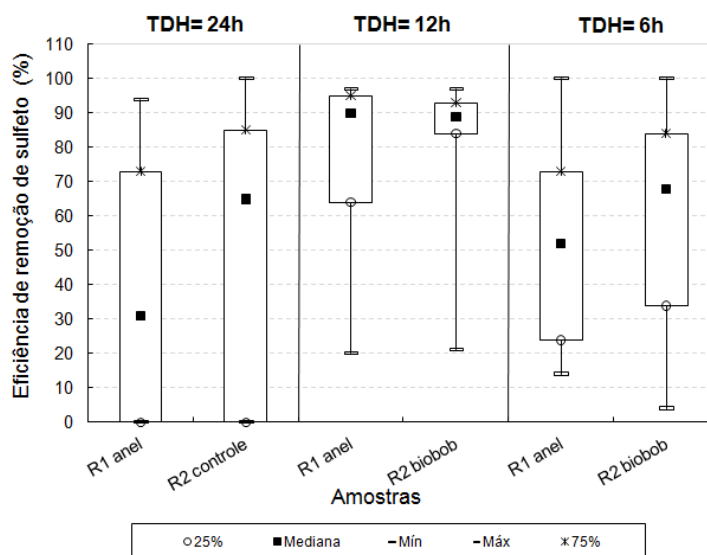
A análise estatística com o teste Kruskal-Wallis ( $\alpha=5\%$ ) demonstrou que não houve diferença estatística entre os reatores quanto ao consumo de sulfeto, nas três fases operacionais, indicando que o consumo entre os reatores foi similar. Contudo, houve diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) 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 material suporte (TDH de 24 h) ou o uso de diferentes meios suportes, tais como o anel plástico ou o biobob (TDH de 12 h e 6 h).

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 a concentração máxima 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. Por outro lado, 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 à concentração de sulfeto no headspace dos reatores, os valores determinados estiveram na faixa de 0 a 3 ppm, 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 mostraram-se na faixa de 7,0 a 7,6 (ver item 5.1.2), a maior parte do sulfeto estava na forma dissolvida na fase líquida.

Com relação à eficiência de remoção de sulfeto (Figura 5.2) 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 5-2:** Eficiência de remoção de sulfeto nos reatores 1 e 2, nas diferentes fases operacionais. (GARCIA, 2014).

Apesar do R2 (controle) não apresentar meio suporte, foi possível verificar a formação de espuma na superfície do reator (semelhante a um tapete microbiano), que era uma camada estratificada na qual a parte superior apresentava coloração verde e a parte inferior, coloração púrpura. As análises microscópicas (apresentadas no próximo item) revelaram a presença de bactérias com morfologia semelhante à da família de sulfobactérias púrpura *Chromatiacea*, que possivelmente poderiam estar envolvidas na remoção de sulfeto nesse reator.

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 meios 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. A queda de eficiência de remoção de sulfeto observada entre as fases 2 (TDH=12h) e 3 (TDH=6h), poderia estar também relacionada a uma eventual saturação da biomassa que foi aproveitada de uma fase para outra. Contudo, as diferenças entre as eficiências dos reatores nas fases 1, 2, e 3, só foram obtidas a partir da comparação

dos valores medianos. Se comparados o conjunto de resultados, as análises estatísticas com o teste Kruskal-Wallis ( $\alpha=5\%$ ) demonstraram que não houve diferenças estatísticas significativas 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.

O balanço de massa de enxofre foi calculado para os dois reatores nas três fases operacionais estudadas e é apresentado na Tabela 5.1. O balanço de enxofre para o reator 1 mostrou que houve acúmulo de enxofre nas três fases operacionais, e que na fase 1 de 24 h, a quantidade de enxofre elementar formada no reator (e que ficou retida na biomassa) foi similar em relação a quantidade de S-sulfato que foi formado e que saiu no efluente. No entanto, na fase 2 de 12 h, maior quantidade de sulfato (2 g) foi formada em relação a quantidade de enxofre elementar (cerca de 0,17 g), mas na fase 3 de 6 h, uma quantidade maior de enxofre elementar foi formada (11,5 g) em relação a quantidade de sulfato (2,0 g) ( Tabela 5.1). No que diz respeito ao reator R2, embora o balanço de massa não tenha fechado, os resultados apresentados na Tabela 5.1 indicam que a formação de enxofre elementar foi mais elevada em comparação com a formação de sulfato, em todas as três fases (ver também Tabela 5.2), indicando que a oxidação biológica de sulfeto a enxofre elementar ocorreu e prevaleceu.

Os resultados do balanço de massa de enxofre (Tabelas 5.1 e 5.2) também mostram que uma quantidade maior de enxofre elementar foi formada (e saiu no efluente) em ambos os reatores quando operado com TDH de 6 horas (11,5 g e 7,7 g no reator 1 e 2, respectivamente) do que com TDH de 12 e 24 horas (0,5 g e 4,5 g no reator 1 e 2, respectivamente). No entanto, uma quantidade maior de enxofre elementar ficou retida na biomassa do reator 1 com TDH de 24h e 12 h (74% e 88%) do que no TDH de 6 horas (9% e 4%, em reator 1 e 2, respectivamente). Em conjunto, estes resultados indicam que, entre as condições testadas, o melhor para a recuperação de enxofre a partir da biomassa foi reator 1 (com anéis de plásticos como material suporte) a TDH de 12 ou 24 horas. No entanto, a recuperação de enxofre a partir do efluente seria mais viável no reator operado no TDH de 6 horas, não necessitando assim interromper o funcionamento do reator ou sacrificar a biomassa formada e estabilizada. Esta formação de enxofre se torna ambientalmente favorável, pois como o mesmo é insolúvel, pode ser removido de meios líquidos, contribuindo para a redução do conteúdo total de compostos de enxofre das águas residuárias.

Portanto, de acordo com os resultados do balanço de massa, no presente estudo o produto final da oxidação de sulfeto nos reatores foi tanto enxofre elementar quanto sulfato. Resultados similares foram 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 autores 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.

**Tabela 5-1:** Resultados do balanço de massa de enxofre entre o afluente e efluente dos reatores 1 e 2 nas três fases operacionais estudadas.

Espécies de Enxofre (g)	Fase 1 - TDH 24 h				
	Afluente	Efluente R1	Biomassa R1	Efluente R2	Biomassa <sup>a</sup> R2
S-Sulfeto	3.0	1.9	nd	1.1	nd
S-Sulfato	4.7	5.3	nd	5.6	nd
S-Tiosulfato	6.1	5.1	nd	5.4	nd
S <sup>0</sup>	0	0.06	<b>0.5</b>	<b>4.5</b>	0.005
<b>Total S</b>	13.8	12.4	0.5	16.7	0.005
Espécies de Enxofre (g)	Fase 2 - TDH 12 h				
	Afluente	Efluente R1	Biomassa R1	Efluente R2	Biomassa <sup>a</sup> R2
S-Sulfeto	5.1	1.3	nd	0.9	nd
S-Sulfato	6.3	8.3	nd	7.4	nd
S-Tiosulfato	3.1	2.7	nd	5.5	nd
S <sup>0</sup>	0	0.04	<b>0.12</b>	<b>4.0</b>	0.05
<b>Total S</b>	14.5	12.3	0.12	17.8	0.05
Espécies de Enxofre (g)	Fase 3 - TDH 6 h				
	Afluente	Efluente R1	Biomassa R1	Efluente R2	Biomassa <sup>a</sup> R2
S-Sulfeto	10.6	5.4	nd	4.0	nd
S-Sulfato	11.5	13.4	nd	16.5	nd
S-Tiosulfato	56.7	56.8	nd	52.6	nd
S <sup>0</sup>	0	<b>10.5</b>	<b>1.0</b>	7.4	0.3
<b>Total S</b>	78.8	86.1	1.0	80.5	0.3

nd: Não determinado

<sup>a</sup> os valores de S<sup>0</sup> determinados na biomassa representam a soma de enxofre elementar determinada nas amostras de lodo e biofilme.

Os valores mais elevados de enxofre elementar determinados para cada fase, na biomassa ou no efluente de cada reator, são apresentados em negrito.

**Tabela 5-2:** Quantidade de enxofre elementar e sulfato formados em um mês de operação dos reatores em cada tempo de detenção hidráulica (24, 12 e 6 horas).

Parâmetro/fase	Reator 1			Reator 2		
	TDH 24	TDH 12	TDH 6	TDH 24	TDH 12	TDH 6
S-sulfato formado (g)	0.6	1.9	2.0	0.9	1.1	5.0
S <sup>0</sup> formado (g)	<b>0.6</b>	<b>0.2</b>	<b>11.5*</b>	<b>4.5</b>	<b>4.1</b>	<b>7.7</b>
S <sup>0</sup> biomassa (%)	88	74	9	0	1	4
S <sup>0</sup> efluente (%)	12	26	91	100	99	96

Os valores em negrito são do total de S<sup>0</sup> determinado (na biomassa e no efluente).

\* Esta quantidade de enxofre elementar formado representa 3,2 g de S / m<sup>3</sup> de efluente anaeróbico tratado .

### 5.1.2 Relação entre pH e potencial redox do afluente e efluente dos reatores

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.

Uma vez que o pH e o potencial redox tem grande influência nas formas de sulfeto que podem estar presentes no sistema, esses parâmetros foram monitorados ao longo da operação dos reatores conforme mostra a tabela 5.2.

**Tabela 5-3:** Valores médios de pH e potencial redox do afluente e efluente dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.

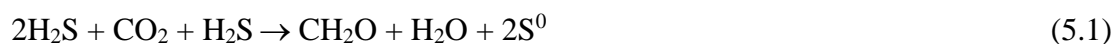
Fase operacional	TDH	Ponto de amostragem	Média pH	Média Potencial redox (Volts)
1	24h	Afluente	7,0	-0,3
		Efluente do R1	7,6	-0,1
		Efluente do R2	7,6	-0,1
2	12h	Afluente	7,0	-0,4
		Efluente do R1	7,0	-0,3
		Efluente do R2	7,0	-0,4
3	6h	Afluente	7,2	-0,3
		Efluente do R1	7,2	-0,3
		Efluente do R2	7,2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

Como pode ser observado na tabela 5.2, 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.

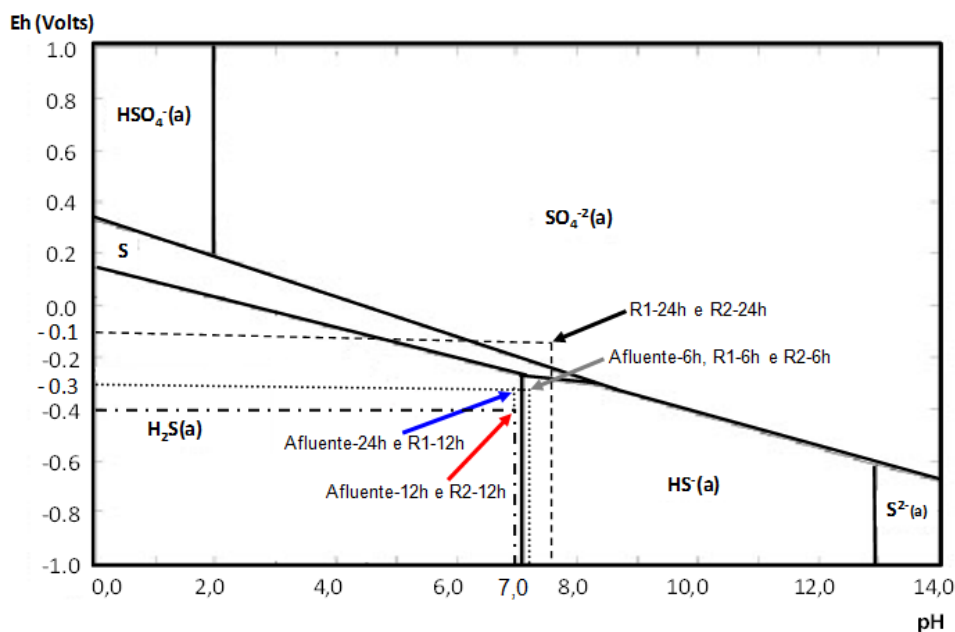
Os resultados da Tabela 5.2 indicam que condições anaeróbias prevaleceram em ambos os reatores e que nas condições de pH encontradas, a forma de sulfeto dissolvido mais encontrada é  $HS^-$  e não  $H_2S$ , como apresentado na figura 5.3. Além disso, quando esses

valores de potencial redox e pH foram inseridos no diagrama de Pourbaix (Figura 5.3), que é uma representação gráfica das possíveis fases de equilíbrio estáveis de um sistema eletroquímico (GENTIL, 1996), é possível verificar que a formação de  $S^0$  por reação química não foi favorecida nos reatores, mas a formação de sulfato (por oxidação química) foi favorecida nos reatores 1 e 2 na fase operacional 1 (TDH de 24 horas).

Portanto, esses resultados indicam que a quantidade de sulfato formada nos reatores e detectada no efluente na fase 1, provavelmente foi derivada da oxidação química e não da oxidação biológica. Entretanto, o sulfato verificado no efluente de ambos os reatores nas fases operacionais 2 e 3 (tabela 5.2), provavelmente deve ter sido oriundo da oxidação biológica uma vez que as condições ambientais que prevaleceram nos reatores (presença de luz, ausência de oxigênio e pH neutro) são favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos fototróficos, tais como as famílias *Chromaticeae* e *Chlorobiaceae*, que foram detectadas e identificadas nas amostras de biofilmes formadas nos reatores (conforme será apresentado a seguir). Na fotossíntese anoxigênica realizada por essas bactérias, sulfeto ou outros compostos reduzidos de enxofre atuam como doadores de elétrons para a fixação de carbono fotossintética, e, compostos de enxofre oxidados tais como enxofre elementar ou sulfato são produzidos, conforme as equações 5.1 e 5.2 a seguir:







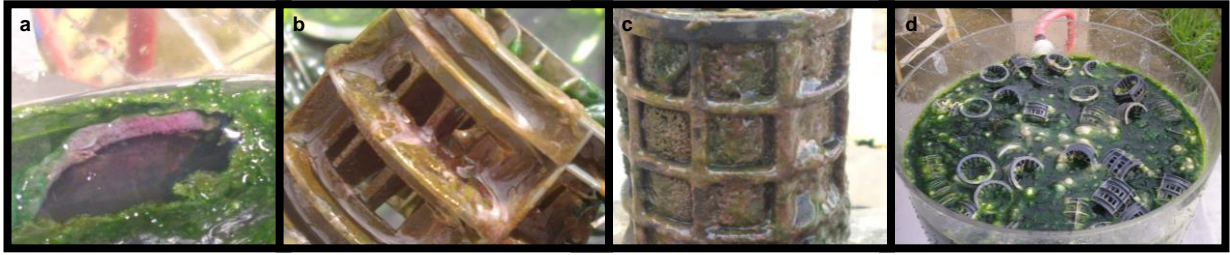
**Figura 5-3:** Diagrama de Pourbaix S/H<sub>2</sub>O, considerando algumas espécies de enxofre em relação a faixa de pH e potencial redox do afluente e dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais.

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. Portanto, como no presente estudo os valores de potencial redox encontrados foram de -0,3V e -0,4 V pode-se concluir que estes valores favoreceram o crescimento de micro-organismos anaeróbios nos reatores e que a formação de S<sup>0</sup> foi provavelmente proveniente da oxidação biológica de sulfeto a enxofre elementar.

## 5.2 Análises microbiológicas das amostras dos reatores nas diferentes fases operacionais

### 5.2.1 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, em todas as fases operacionais, sendo que a figura 5.4 mostra como a biomassa (dispersa ou aderida) ficou retida em ambos os reatores.



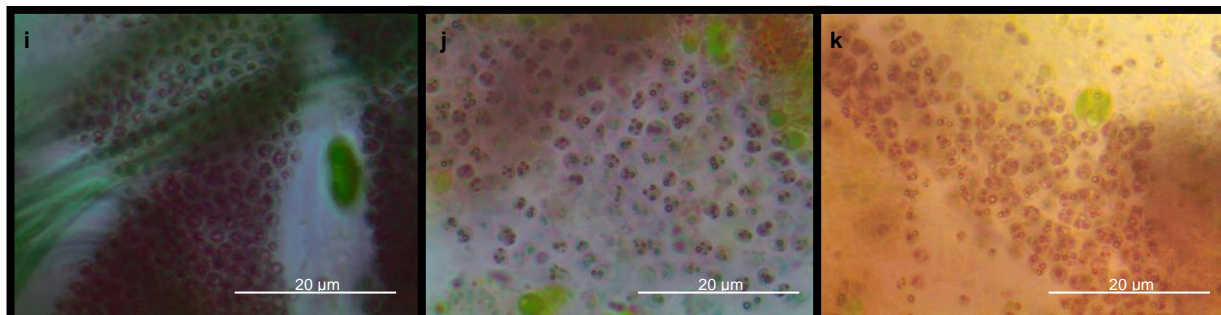
**Figura 5-4:**(a-d) Imagens da biomassa microbiana que se desenvolveu durante a oxidação biológica de sulfeto nos reatores R1 e R2. Legenda: (a) espuma formada no R2-24h (sem meio suporte); (b) biofilme formado no reator R1-24h; (c) biofilme formado no reator R2-12h; (d) aparência da superfície do reator R1-24h, com detalhe do material suporte com pontos brancos correspondentes ao enxofre elementar.

Após 147 dias de operação foi possível visualizar glóbulos brancos na superfície do R1-24h indicando a presença de enxofre elementar (figura 5.4 d), sendo mais um indicativo de oxidação biológica de sulfeto a enxofre elementar que corrobora 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.

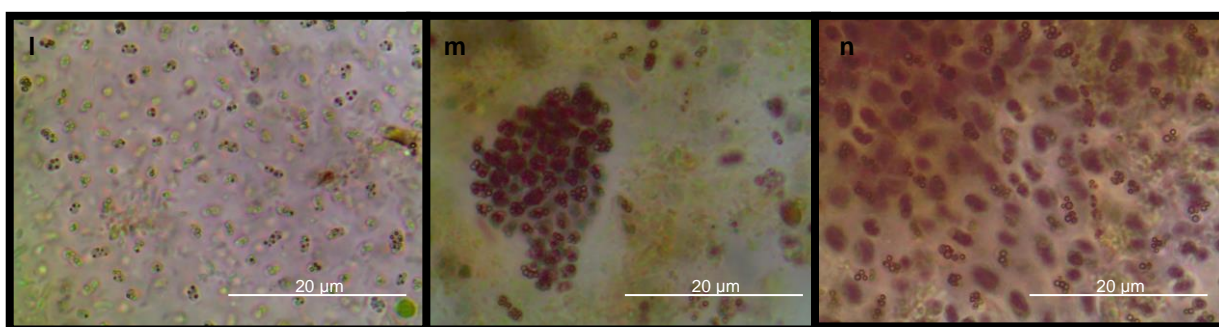
Uma vez que a presença de enxofre elementar foi detectada, as observações microscópicas foram realizadas a fim de verificar a presença de bactérias oxidadoras de sulfeto. Os resultados mostraram, em ambos os reatores e em todas as fases operacionais, a presença de bactérias com morfologia de cocos, hastes ou bastonetes, contendo grânulos intracelulares, coloração rosa - avermelhada, vermelho-acastanhada, vermelho-púrpura e púrpura-violeta, características que são similares às bactérias da família *Chromatiaceae*. Estas bactérias, na presença tanto de sulfeto quanto de luz, formam glóbulos de  $S^0$  no interior das células, que posteriormente são oxidados para sulfato (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os gêneros *Chromatium okenii*, *Allochromatium vinosum*, *Thiocystis violacea*, *Thiocystis gelatinosa* são exemplos de sulfobactérias púrpuras que tem crescimento ótimo com temperaturas de 20-35°C, pH ligeiramente neutro, são fotolitoautotróficas em condições anóxicas e com incidência de luz, lembrando que tais condições foram encontradas em ambos os reatores, além disso acumulam enxofre em grânulos intracelulares e contêm membranas fotossintéticas internas em que os pigmentos fotossintéticos bacterioclorofila e carotenóides estão localizados, ademais, os gêneros *Allochromatium* e *Thiocystis* também utilizam o tiosulfato como doadores de elétrons (BRENNER *et al.* 2005a).

Micro-organismos semelhantes às bactérias da família *Chromatiaceae*, foram observadas nos resultados da análise de microscopia óptica das amostras de biomassa dos reatores R1 e R2, nas três fases operacionais, como mostram as figuras 5.5 com amostras do reator R1 e 5.6 com amostras do reator R2.



**Figura 5-5:** (i-k) Microscopia óptica da biomassa retirada do reator R1 com material suporte anel plástico. Legenda: (i) R1-24h; (j) R1-12h; (k) R1-6h.



**Figura 5-6:** (l-n) Microscopia óptica da biomassa retirada do reator R2. Legenda: (l) R2-24h sem meio suporte; (m) R2-12h e (n) R2-6h com material suporte Biobob.

Estas bactérias são gram-negativas e podem apresentar morfologia de cocos, hastes ou bastonete e já foram encontradas em sistemas de tratamento de águas residuárias (SIEFERT *et al.*, 1978). 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 e/ou a sulfato.

Com relação à presença de outros micro-organismos nos reatores, juntamente com micro-organismos similares aos da família de sulfobactéria *Chromatiaceae*, cianobactérias e algas foram observadas por microscopia em todas as amostras dos reatores, o que pode ser um aspecto positivo para a operação dos mesmos, de modo que certa produção de oxigênio pode auxiliar na oxidação dos compostos reduzidos por outros micro-organismos (SILVA *et al.*

2005). 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 sulfobactérias fototróficas 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 formada tanto na biomassa suspensa (figura 5.4a) quanto no reator com biomassa aderida (figura 5.4d), além disso, quando esta camada era removida era possível visualizar uma coloração púrpura aderida a biomassa em suspensão (figura 5.4a) e aos materiais suporte, conforme apresentado na figura 5.4 b e c.

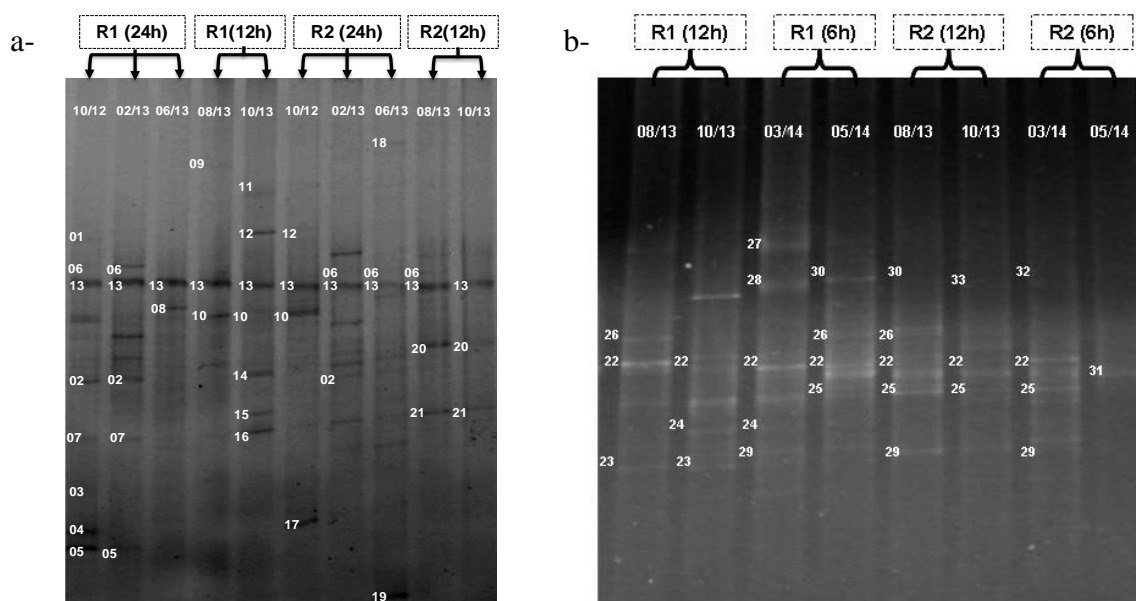
No presente trabalho, não foram encontradas morfologias similares à *Beggiatoa* e *Thiotrix* que são gêneros de sulfobactérias incolores aeróbias. Esses resultados diferem daqueles obtidos por Garcia *et al.* (2012), que observaram esses micro-organismos na espuma do reator UASB, que foi o mesmo reator utilizado neste estudo para alimentar os reatores R1 e R2. A razão para a ausência das sulfobactérias incolores nos reatores do presente estudo deve estar relacionada à condição anaeróbia/anóxica verificada nos mesmos (conforme discutido anteriormente), mas também poderia ser devido a ocorrência de competição pelo sulfeto, entre estas sulfobactérias incolores e as púrpuras (*Chromatiaceae*). 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).

## **5.2.2 Caracterização da estrutura da comunidade bacteriana dos reatores R1 e R2.**

### **5.2.2.1 Estrutura da comunidade bacteriana nas fases operacionais 1 e 2.**

A fim de verificar a estrutura e a dinâmica da comunidade bacteriana desenvolvida nos reatores R1 e R2, nas diferentes fases operacionais, foi realizada a análise de PCR-DGGE. Na figura 5.7a é apresentado o perfil de DGGE da comunidade bacteriana para as amostras dos

reatores nas fases operacionais 1 e 2. A figura 5.7b mostra o perfil de DGGE da comunidade nas fases operacionais 2 e 3, e ressalta-se que para esta comparação foram utilizadas as mesmas amostras dos reatores da fase 2 (TDH 12 horas) apresentadas no gel da figura 5.7a.



**Figura 5-7:** Análise da comunidade bacteriana usando eletroforese desnaturante (DGGE). Perfil do DGGE da comunidade bacteriana amostrados em momentos diferentes ao longo das três fases operacionais dos reatores 1 e 2: (a) as fases 1 e 2 (TDH 24 e 12 h); (b) as fases 2 e 3 (TDH de 12 e 6h).

As bandas mais fortes do gel foram numeradas, excisadas e o DNA foi sequenciado para identificação dos micro-organismos dominantes em cada amostra dos reatores 1 e 2, nas condições testadas, tais como presença e ausência de meio suporte (TDH=24 h) e comparação entre o tipo de material suporte, anel plástico e biobob (TDH=12 h e TDH=6 h) (Tabela 5.4).

**Tabela 5-4:** Posição taxonômica das bandas do DGGE obtidas das amostras dos reatores R1 e R2 (TDH 24 h, 12h e 6 h), de acordo com RDP Classifier em um nível de confiança de 80% e as seqüências mais próximas obtidas no GenBank relacionadas ao gene 16S rRNA das amostras coletadas dos reatores 1 e 2 no TDH de 24 h, 12 h e 6 h, através da ferramenta BLAST, apresentando a porcentagem de similaridade.

Bandas	Posição Taxonômica	Nº de acesso no Genbank	Gene RNAr16S	% Similaridade*
1,12	Filo Firmicutes Classe Clostridia Ordem Clostridiales Família Clostridiales incertae sedis** Gênero Soehngenia	AB896675	<i>Uncultured Firmicutes bacterium</i>	99%

2	Filo Proteobacteria Classe Betaproteobacteria Ordem Burkholderiales Família Burkholderiales incertae sedis Gênero Tepidimonas	KF206381	<i>Tepidimonas</i> sp.	100%
3	Filo Proteobacteria Classe Gammaproteobacteria Ordem Xanthomonadales Família Xanthomonadaceae	JQ349048	<i>Lysobacter</i> sp.	97%
4	Filo Proteobacteria Classe Gammaproteobacteria Ordem Xanthomonadales Família Xanthomonadaceae	KF911330	<i>Lysobacter brunescens</i>	97%
5	<b>Filo Proteobacteria</b> <b>Classe Alphaproteobacteria</b> <b>Ordem Rhodospirillales</b> <b>Família Rhodospirillales incertae sedis</b> <b>Gênero Rhodocista</b>	<b>NR_025830</b>	<b><i>Rhodocista pekingensis</i></b>	<b>98%</b>
6	Filo Cyanobacteria	EF123634	<i>Uncultured Cianobacterium</i>	92%
7,15	Filo Proteobacteria Classe Gammaproteobacteria Ordem Xanthomonadales Família Xanthomonadaceae Gênero <i>Thermomonas</i>	FJ821616	<i>Thermomonas</i> sp	100%
8	Filo Proteobacteria Classe Gammaproteobacteria Ordem Methylococcales Família Methylococcaceae	KJ081955	<i>Methylomonas</i> sp	98%
9	<b>Filo Chlorobi</b> <b>Classe Chlorobia</b> <b>Ordem Chlorobiales</b> <b>Família Chlorobiaceae</b>	<b>DQ383316</b>	<b><i>Uncultured Chlorobium</i> sp</b>	<b>90%</b>

10,22	<b>Filo Proteobacteria</b> <b>Classe Gammaproteobacteria</b> <b>Ordem Chromatiales</b> <b>Família Chromatiaceae</b>	HQ003533	<i>Uncultured Chromatiaceae bacterium</i>	97%
11	Filo Firmicutes Classe Clostridia Ordem Clostridiales Família Clostridiales incertae sedis Gênero <i>Soehngenia</i>	NR_025761	<i>Soehngenia saccharolytica</i>	97%
13,33	Filo Proteobacteria Classe Betaproteobacteria	KC492099	<i>Gulbenkiania mobilis</i>	87%
14	<b>Filo Proteobacteria</b> <b>Classe Alphaproteobacteria</b> <b>Ordem Rhizobiales</b> <b>Família Bradyrhizobiaceae</b>	FJ210722	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	93%
16	Filo Bacteroidetes Classe Bacteroidia Ordem Bacteroidales Família Porphyromonadaceae	GU179797	<i>Uncultured Bacterioides bacterium</i>	93%
17	<b>Filo Proteobacteria</b> <b>Classe Alphaproteobacteria</b> <b>Ordem Rhodospirillales</b> <b>Família Rhodospirillaceae</b>	NR_025830	<i>Rhodospirillum centenum</i>	99%
18	Filo Cyanobacteria	EF123634	<i>Uncultured Cianobacterium</i>	92%
19	Filo Chloroflexi Classe Chloroflexia Ordem Chloroflexales Gênero <i>Chloroflexaceae</i>	JX298781	<i>Chloronema giganteum</i>	91%

20,25	<b>Filo Proteobacteria</b> <b>Classe Alphaproteobacteria</b> <b>Ordem Rhizobiales</b> <b>Família Bradyrhizobiaceae</b>	FJ210722	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	99%
21, 29	Filo Proteobacteria Classe Gammaproteobacteria Ordem Xanthomonadales Família Xanthomonadaceae Gênero <i>Thermomonas</i>	KF7170461	<i>Thermomonas</i> sp	99%
23	Filo Proteobacteria Classe Gammaproteobacteria	HM984596.1	<i>Pseudomonas</i> sp.	83%
24	Filo Bacteroidetes Classe Bacteroidia Ordem Bacteroidales Família Porphyromonadaceae	JQ346770.1	<i>Uncultured Bacteroidetes bacterium</i>	84%
26	Filo Verrucomicrobia Classe Opitutae Ordem Opitutales Família Opitutaceae	CU925220.1	Uncultured <i>Verrucomicrobium</i> bacterium	97%
27	Filo Bacteroidetes Classe Sphingobacteriia Ordem Sphingobacteriales Família Chitinophagaceae	HM124372.1	<i>Terrimonas</i> sp.	99%
28	Filo Bacteroidetes Classe Sphingobacteriia Ordem Sphingobacteriales Família Chitinophagaceae	KF206394.1	<i>Hydrotalea</i> sp.	99%
30	<b>Filo Chlorobi</b> <b>Classe Chlorobia</b> <b>Ordem Chlorobiales</b> <b>Família Chlorobiaceae</b>	AY394785.1	<i>Chlorobaculum</i> sp.	94%



31	Filo Proteobacteria Classe Betaproteobacteria Ordem Burkholderiales Família Comamonadaceae	KJ127965.1	<i>Uncultured Acidovorax</i> sp.	99%
32	Filo Firmicutes Classe Clostridia Ordem Clostridiales Família Clostridiales incertae sedis**	AB702885.1	<i>Clostridiales</i> bacterium	90%

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

\*\* Com posição incerta dentro da família.

As bandas destacadas em negrito se referem àquelas com sequências relacionadas a bactérias fototróficas púrpuras e verdes.

A seguir a tabela 5.5. mostra a diversidade de micro-organismos que foram encontrados em ambos os reatores e fases operacionais distintas, podemos ver que em todas as fases operacionais e em ambos os reatores foram encontrados micro-organismos relacionados com as sulfobactérias púrpuras e que somente no R1-24h e R2-6h não foram encontrados micro-organismos relacionados com sulfobactérias verdes.

**Tabela 5-5:** Diversidade de micro-organismos encontrados nos reatores 1 e 2 em cada fase operacional (24 h, 12 h e 6 h).

	R1	R2
24h	<i>Rhodocista pekingensis</i> <i>Gulbenkiania mobilis</i> <i>Tepidimonas</i> sp. <i>Thermomonas</i> sp. <i>Methylomonas</i> sp. <i>Uncultured Firmicutes bacterium</i> <i>Lysobacter</i> sp. <i>Uncultured Cyanobacterium</i>	<i>Uncultured Chromatiaceae bacterium</i> <i>Rhodospirillum centenum</i> <i>Chloronema giganteum</i> <i>Gulbenkiania mobilis</i> <i>Tepidimonas</i> sp. <i>Uncultured Firmicutes bacterium</i> <i>Uncultured Cyanobacterium</i>
12h	<i>Uncultured Chromatiaceae bacterium</i> <i>Uncultured Chlorobium</i> sp. <i>Gulbenkiania mobilis</i> <i>Thermomonas</i> sp. <i>Uncultured Firmicutes bacterium</i> <i>Soehngenia saccharolytica</i> <i>Uncultured Bacterioides bacterium</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Uncultured Verrucomicrobium bacterium</i>	<i>Uncultured Chromatiaceae bacterium</i> <i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>Gulbenkiania mobilis</i> <i>Thermomonas</i> sp. <i>Uncultured Verrucomicrobium bacterium</i> <i>Chlorobaculum</i> sp.
6h	<i>Uncultured Chromatiaceae bacterium</i> <i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>Uncultured Bacteroidetes bacterium</i> <i>Uncultured Verrucomicrobium bacterium</i> <i>Terrimonas</i> sp. <i>Hydrothalea</i> sp. <i>Chlorobaculum</i> sp.	<i>Uncultured Chromatiaceae bacterium</i> <i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>Thermomonas</i> sp. <i>Uncultured Acidovorax</i> sp. <i>Clostridiales</i> bacterium

As bandas destacadas em negrito se referem àquelas com sequências relacionadas a bactérias fototróficas púrpuras e verdes.

A banda 5, presente no R1-24h, a banda 17 presente no R2-24h, e as bandas 14, 20 e 25 presentes no R1-12h, R2-12h, R1-6h e R2-6h apresentaram sequências próximas, respectivamente, às sequências de bactérias púrpuras não sulfuradas como *Rhodocista pekingensis*, *Rhodospirillum centenum*, e *Rhodopseudomonas palustris*. Essas bactérias podem estar envolvidas na degradação de ácidos graxos voláteis de cadeia curta presentes em águas residuárias (OKUBO *et al.*, 2006). *Rhodocista pekingensis* foi isolada do tratamento de águas residuárias, é bactéria gram-negativa, que pode apresentar crescimento fototrófico anaeróbico ou quimioheterotrófico aeróbico e é capaz de utilizar H<sub>2</sub> como doador de elétrons (ZHANG *et al.*, 2003).

*Rhodopseudomonas palustris*, está amplamente distribuída na natureza e tem grande versatilidade metabólica, crescendo por via fotoautotrófica, fotoheterotrófica, quimioheterotrófica e quimioautotrófica, pode oxidar compostos inorgânicos tais como o gás hidrogênio, tiosulfato e alguns estudos mencionam também a utilização de sulfeto em baixas concentrações (NEUTZLING, PFLEIDERER e TRUPER, 1985; LARIMER *et al.*, 2004). Este gênero teve seu genoma sequenciado por LARIMER *et al.* (2004), no qual foram encontrados muitos genes associados ao metabolismo energético e genes semelhantes aos codificados por micro-organismos redutores de compostos de enxofre, refletindo a sua versatilidade metabólica.

Isso demonstra que além de ocorrerem em sistemas de tratamento de águas residuárias e estarem envolvidas na degradação de ácidos orgânicos de cadeia curta (OKUBO *et al.*, 2006), mesmo classificadas como não-sulfurosas, poderiam estar associadas a oxidação de tiosulfato e sulfeto como mencionado também por HANSEN e VAN GEMERDEN (1972), contribuindo para eficiência observada nos TDHs de 12h e 6h em ambos os reatores.

As bandas 10 e 22, que só não foram encontradas no R1-24h, apresentaram sequência relacionada a bactéria não cultivada de *Chromatiaceae*, que constitui uma das principais famílias de sulfobactérias púrpuras (MADIGAN *et al.*, 2010). Enquanto que a banda 9 (presente somente no R1-12h) apresentou 90% de similaridade com a bactéria não cultivada *Chlorobium* sp., essa similaridade baixa indica que o micro-organismo pertence à família *Chlorobiaceae*. Em relação ao micro-organismo relacionado a banda 19 (presente somente no R2-24h), a posição taxonômica mostra que pertence a ordem *Chloroflexales* e teve apenas 91% de similaridade com *Chloronema giganteum* que é uma espécie de sulfobactéria

fototrófica verde filamentosa, comumente encontrada em lagos, tapetes microbianos e em fontes geotérmicas, contendo baixas concentrações de sulfeto (ABELLA *et al.*, 1992). Esses resultados demonstram que bactérias fototróficas púrpuras e verdes, estavam presente nos reatores e provavelmente estavam envolvidas na oxidação de sulfeto à enxofre elementar ou a sulfato.

As bandas 13 e 33 estão relacionadas com a classe *Betaproteobactéria*. Essas bactérias são gram-negativas, aeróbias, quimioheterotróficas e já foram isoladas do tratamento de águas residuárias. O crescimento desse micro-organismo ocorre na presença de nitrato (MOREIRA *et al.*, 1997).

A banda 2, presente no R1-24h e R2-24h, apresentou sequencia relacionada com o gênero *Tepidimonas*, que são bactérias quimilitheterotróficas, ligeiramente termofílicas e aeróbias, capazes de oxidar tiosulfato e tetrionato a sulfato (MOREIRA, 1997). Assim, 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.

As bandas 7, 15, 21 e 29 foram encontradas em todos os reatores, com exceção do R2-24h e R1-6h, apresentaram sequências proximamente relacionadas à sequência de *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 banda 1, presente somente no R1-24h e a banda 12, presente no R1-12h e R2-24h, apresentaram sequência com 99% de similaridade à sequência de representante não cultivado do filo *Firmicutes*. Os membros desse filo podem ser aeróbios, 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). A banda 11, presente somente no R1-12h, apresentou sequência próxima a *Soehngenia saccharolytica*, essa bactéria é mesofílica, anaeróbia, mas aerotolerante e fixadora de nitrogênio molecular, observando que a posição taxonômica identificada pelo RDP

Classifier das bandas 1 e 12 acima descritas, também identificou esse gênero. Sulfeto e tiosulfato são pouco utilizados por esses micro-organismos como aceptores de elétrons e geralmente é encontrada em lodo de digestores anaeróbios (PARSHINA *et al.*, 2003).

As bandas 3 e 4, presentes somente no R1-24h, apresentaram similaridade 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 16 foi detectada somente no R1-12h e foi relacionada à família *Porphyromonadaceae* do filo *Bacteroidetes*, esse filo tem distribuição bem ampla no ambiente, podem realizar fermentação e são encontrados 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 baixa similaridade com sequência de cianobactéria não cultivada. A presença de cianobactérias também foi observada na microscopia óptica nas amostras dos reatores, nos TDH de 24h, 12h e 6h.

A banda 23 presente no R1-12h apresentou sequência relacionada com a classe *Gammaproteobactéria*. Esses micro-organismos possuem necessidades nutricionais diversas, sobrevivendo em uma grande variedade de ambientes. Encontram-se amplamente distribuídas no solo e na água, e podem também fazer parte da microbiota normal do trato intestinal e pele de 3 a 5 % da população (BRENNER *et al.*, 2005a).

Também apresentando similaridade baixa, a banda 24, encontrada no R1-12h e R1-6h, foi relacionada ao filo *Bacteroidetes*, que com grande diversidade colonizam quase todos os tipos de ambientes, estão entre os principais membros da microbiota de animais, especialmente no trato gastrointestinal, podem atuar como patógenos e são frequentemente encontrados em solos, oceanos e água doce. Nestes nichos ecológicos contrastantes, *Bacteroidetes* são cada vez mais considerados como especialistas para a degradação da matéria orgânica de alto peso molecular, ou seja, proteínas e carboidratos (THOMAS *et al.* 2011).

A banda 26 foi similar a *Verrucomicrobium* sp. presente nos reatores R1-12h, R2-12h e R1-6, que são micro-organismos heterotróficos aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de

fermentar vários açúcares, encontrados na água doce e marinha, assim como em solos de florestas e agriculturáveis (MADIGAN *et al.*, 2010).

Micro-organismo similar a *Terrimonas* sp. identificado pela banda 27 foi encontrado no reator R1-6h, membros desse gênero são geralmente aeróbios com coloração de amarelo a salmão-avermelhada, gram-negativos, organotróficos e encontrados em solo poluído (ZANG *et al.*, 2012). A sequência da banda 28 foi similar ao gênero *Hydrothalea*, constituído por bactérias levemente termofílicas, aeróbias e organotróficas, isoladas de águas termais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012), e foi encontrada somente no reator R1-6h.

Já a banda 30 apresentou sequencia relacionada à família *Chlorobiaceae* e foi encontrada nos reatores R1-6h e R2-12h. Trata-se de um grupo composto por sulfobactérias verdes que realizam fotossíntese anoxigênica e que depositam grânulos de enxofre externamente à célula, podem usar enxofre, sulfeto ou hidrogênio como doador de elétrons (MADIGAN *et al.*, 2010).

A banda 31 encontrada apenas no reator R2-6h, teve a sequência similar a bactéria não cultivada do gênero *Acidovorax*, que é gram-negativa, aeróbia, algumas cepas são capazes de desnitrificação heterotrófica. São isoladas a partir do solo, da água, amostras clínicas, sistemas de lodos ativados (BRENNER, *et al.* 2005b; MAINTINGUER, *et al.* 2013) e também reator anóxico rico em nitrato (ETCHEBEHERE *et al.*, 2001).

Membros da ordem *Clostridiales* identificada pela banda 32 são anaeróbios, fazem parte da microbiota intestinal, usualmente quimiorganotrófica com algumas espécies quimiolitotróficas (VOS *et al.*, 2009).

Com relação a presença de sulfobactérias, *Chromatiaceae* é uma família de sulfobactérias púrpuras gram-negativas, que podem realizar a oxidação de sulfeto e acumular grânulos de enxofre intracelular (MADIGAN *et al.*, 2010), esse grupo só não foi encontrado nas amostras do reator R1-24h como mostra a tabela 5.5, mas micro-organismos semelhantes foram encontrados nas amostras dos reatores R1 e R2 em todas as fases operacionais, analisadas por microscopia óptica. Enquanto que *Chloronema giganteum* é uma espécie de sulfobactéria fototrófica verde e filamentosa, que é comumente encontrada em lagos, tapetes microbianos e em fontes geotérmicas, contendo baixas concentrações de sulfeto (ABELLA *et al.*, 1992).

As sequencias relacionadas as sulfobactérias verdes dos gêneros *Chlorobium* e *Chlorobaculum* pertencem a família *Chlorobiaceae* que são fototróficas, anaeróbias e são comumente encontradas em ambientes aquáticos anóxicos, sedimentos e outros ambientes onde a incidência de luz penetra em profundidades em que a água contém sulfeto de hidrogênio (VAN DEN ENDE e VAN GEMERDEN, 1993; MADIGAN *et al.*, 2010).

De modo geral as bactérias verdes sulfurosas são mais tolerantes ao sulfeto do que as púrpuras sulfurosas, necessitando de menor quantidade de luz para realização das atividades fotossintéticas, sendo estas geralmente encontradas em maiores profundidades. O enxofre elementar é depositado em grânulos fora da célula, mas podem ainda ser oxidados (MADIGAN *et al.*, 2010; BRYANT *et al.* 2006).

Tanto nas análises de microscopia como da PCR-DGGE, foram encontradas cianobactérias que, segundo Stal (1995), podem coexistir com bactérias fototróficas sulfurosas 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.

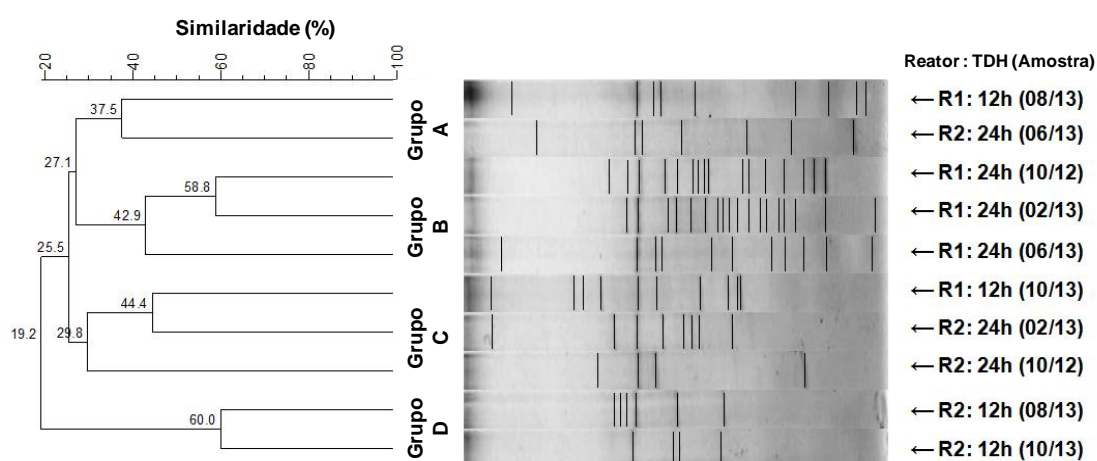
Em suma, os resultados do PCR-DGGE demonstraram que a comunidade bacteriana presente nos reatores 1 e 2, nas três fases operacionais, foi diversificada apresentando bactérias com diferentes metabolismos: heterotrófico (como *Rhodopseudomonas* sp.; *Pseudomonas* sp.), fermentativo (como *Firmicutes*), bactérias oxidadoras de metano (*Methylomonas* sp.), bactérias fototróficas como as sulfobactérias verdes da família *Chlorobiaceae* e as sulfobactérias púrpuras da família *Chromatiaceae*. Portanto, além da oxidação de sulfeto, provavelmente outros metabolismos relacionados a oxidação de matéria orgânica, também estavam ocorrendo nesses reatores.

É importante ressaltar que a análise do PCR-DGGE não recuperou bandas relacionadas a bactérias nitrificantes, tais como *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* ou *Nitrospira*, ou bandas relacionadas as oxidadoras de sulfeto dos gêneros *Beggiatoa*, *Thioploca*, *Thiobacillus* ou *Thiobacillus denitrificans*. Além disso, as concentrações de nitrito e nitrato determinadas no afluente e efluente dos reatores foram muito baixas (0,3 mg/L de nitrito e 0,6 mg/L de nitrato, GARCIA, 2014) e similares entre o afluente e efluente. Portanto, indicando que embora o efluente do reator UASB tivesse nitrogênio amoniacal (concentração em torno de 29 a 47

mg/L), este nitrogênio não estava sendo transformado dentro dos reatores, e consequentemente a nitrificação não estava ocorrendo. Provavelmente, a oxidação de sulfeto acoplada a desnitrificação autotrófica também não deve ter ocorrido nos reatores, ou, aconteceu em tão baixa proporção que não foi detectada.

### 5.2.3 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 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 obtidas dos géis de DGGE. A figura 5.8 mostra a análise das fases operacionais 1 e 2.



**Figura 5-8:** 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 5.8 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.

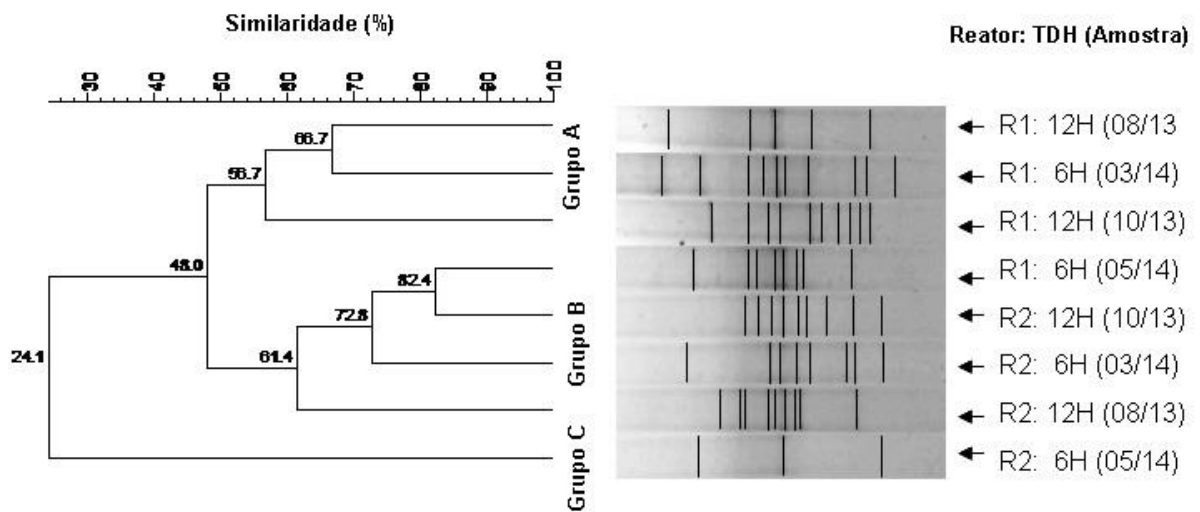
Como é possível observar na figura 5.8, o grupo D apresentou maior porcentagem de similaridade (60%) entre as amostras 08/13 e 10/13 do R2, ou seja, o curto intervalo de dois meses entre as coletas, no TDH de 12h, foi a condição que apresentou menor influência na mudança do perfil da comunidade bacteriana. 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 ao longo do tempo e na mesma fase operacional, no qual não havia meio suporte.

Na figura 5.8 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 (suporte: anéis plásticos) não foi similar ao perfil obtido no grupo D, correspondente a amostra do R2-12h (suporte: biobob), indicando que diferentes meios suportes selecionaram comunidades bacterianas distintas.

A seguir são comparadas as fases operacionais 2 e 3 onde o intuito foi avaliar a influência do tipo de material suporte na retenção e diversidade de micro-organismos (figura 5.9).





**Figura 5-9:** Dendrograma do perfil da comunidade bacteriana do DGGE dos reatores 1 (suporte: anel plástico) e 2 (suporte: Biobob), nas duas diferentes fases operacionais (TDH de 12h e 6h). À direita contém os dados quanto a especificação do reator, TDH e amostra; à esquerda indica a porcentagem de similaridade e identificação dos grupos.

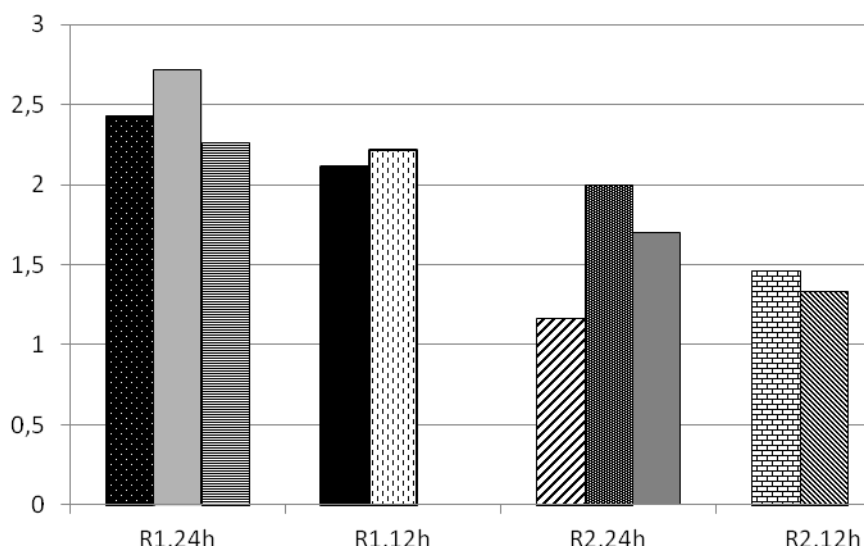
Conforme a análise do perfil de bandas do agrupamento do DGGE das amostras das fases operacionais 2 e 3 da figura 5.9, foram formados três grandes grupos (A, B e C). As amostras do reator R1 (suporte: anel plástico) em ambas as fases operacionais, se dividiram em 2 grupos distintos (A e B), com baixa similaridade entre si (48.0%). Não obstante, as amostras da fase operacional 2 (TDH 12h) apresentaram similaridade maior entre si (57%), quando comparada com aquelas da fase operacional 3 (TDH 6h).

Assim, esses perfis indicam que a estrutura da comunidade variou ao longo do tempo dentro do mesmo reator, e na mesma fase operacional, e que a redução do TDH de 12 para 6 horas, alterou a estrutura da comunidade bacteriana. Já as amostras do reator R2, se dividiram em 2 grupamentos distintos (B e C) com baixa similaridade entre si, indicando que dentro do mesmo reator e na mesma fase operacional as amostras variaram bastante ao longo do tempo, e da mesma forma que no reator 1, a redução do TDH de 12 para 6 horas alterou a estrutura da comunidade microbiana. Especificamente no caso do reator 2 (suporte: Biobob), a redução do TDH reduziu o número de bandas no perfil de DGGE, sugerindo uma redução da diversidade da comunidade. A coexistência de grupos de micro-organismos metabolicamente diversificados no biofilme de ambos os reatores e a riqueza de espécies encontradas dentro destes grupos metabólicos, pode ser muito importante para estabilidade e funcionamento a longo prazo de cada reator.

Biofilmes heterogêneos compostos por diferentes membros fisiológicos e ecológicos podem ser mais adaptados e resistentes do que culturas puras para suportar grandes perturbações nas condições ambientais, tais como a redução do TDH que aconteceu da fase 2 de 12h para a fase 3 de 6h. A presença de mais de um grupo com o mesmo perfil metabólico (por exemplo, *Chromatiaceae* e *Chlorobiaceae*) poderia assegurar a continuidade do funcionamento caso alguma mudança (de TDH, pH ou temperatura) afetasse uma das populações.

#### 5.2.3.1 Biodiversidade

A fim de avaliar a riqueza das espécies (diversidade) nos reatores, o índice de Shannon ( $H'$ ) foi calculado a partir dos géis de DGGE, nas diferentes fases operacionais (figura 5.7a e 5.7b). A maioria das amostras dos reatores 1 e 2 (nas fases operacionais 24h e 12h) apresentou moderada diversidade bacteriana, com o  $H'$  variando de 2,0 a 2,5 (Figura 5.10 abaixo). As exceções foram as amostras do reator 2 na fase operacional 2 com TDH de 12h ( $H'$  em torno de 1,5) e também na fase 1 ( $H'= 1,2$ ).



**Figura 5-10:** 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.

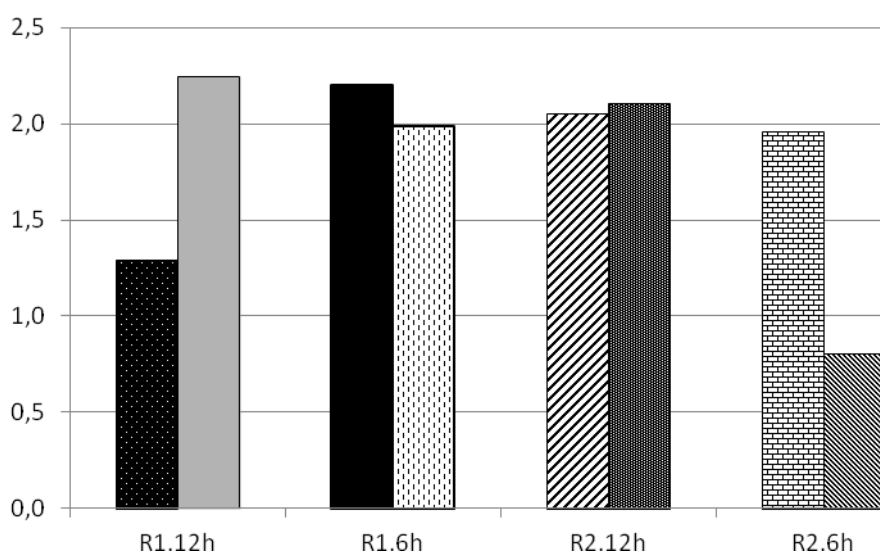
Conforme figura 5.10 pode-se observar que as três amostras do reator 1(R1), no TDH de 24h apresentaram os maiores índices de diversidade, quando comparado com as amostras do R1, no período de 12h e do reator 2 em ambos os períodos. Considerando que o reator 1, em ambas as fases, foi preenchido com o mesmo material suporte (anel plástico) é possível verificar um decaimento do índice de diversidade, com a redução do TDH de 24 para 12. Portanto, a diminuição do TDH no reator influenciou a diversidade de bactérias no biofilme, uma vez que o maior tempo de residência hidráulica (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 os reatores (R1 e R2), na mesma fase operacional (TDH de 24h), pode-se 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 ( $1,62 \pm 0,42$ ), 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, pois como descrito por Ferrera *et al.* (2004), 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.

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) na mesma fase operacional (TDH de 12h), o reator 1 contendo anel plástico apresentou valores médios de H maiores do que o R2 (R1:  $2,16 \pm 0,08$  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), o que pode contribuir para estabilidade e funcionamento do reator a longo prazo.

A figura 5.11 mostra o índice de Shannon para as amostras dos reatores 1 (TDH 12h e 6h) e 2 (TDH 12h e 6h), para as fases experimentais 2 e 3.



**Figura 5-11:** Índice de Shannon das amostras dos reatores 1 e 2 nas duas diferentes fases operacionais ( TDH de 12h e 6h). Legenda: R1-12: amostras do reator 1, preenchido por anéis plásticos, no TDH de 12h. R1 - 6: amostras do reator 1 , preenchido por anéis plásticos, no TDH de 6h. R2-12: amostras do reator 2, preenchido por biobob, no TDH de 12h. R2-6: amostras do reator 2, preenchido por biobob, no TDH de 6h.

Com relação ao índice de Shannon da figura 5.11 referente ao TDH de 12h e 6h, foi possível observar que as duas amostras do reator R1, no TDH de 12h e 6h apresentaram os maiores índices de diversidade, 2,25 e 2,20 respectivamente, quando comparado com as amostras do R2. Considerando que o reator 1, em ambas fases aqui analisadas, foi preenchido com o mesmo material suporte (anel plástico), é possível verificar que mesmo com a redução do

TDH de 12h para 6h o índice de diversidade não diminuiu, assim podemos inferir que o material suporte possibilitou uma melhor retenção da biomassa . O que não foi observado com as amostras do reator R2, onde ocorreu um ligeiro decaimento do índice de diversidade com a diminuição do TDH de 12h para 6h. Diante disso, possivelmente o meio suporte anel plástico apresentou maior aptidão à retenção dos micro-organismos no R1, quando comparado com o biobob no R2.

## 6 CONCLUSÕES

A investigação da estrutura e dinâmica da comunidade bacteriana nos reatores de oxidação biológica de sulfeto, através do PCR-DGGE, revelou que a comunidade foi extremamente diversificada e muito dinâmica, variando ao longo do tempo dentro de um mesmo reator e na mesma fase operacional, bem como entre os reatores. Bactérias fototróficas púrpuras e verdes envolvidas na oxidação de sulfeto de hidrogênio foram detectadas tanto através dos perfis de DGGE, quanto através da microscopia óptica, indicando que houve razoável concordância qualitativa entre os micro-organismos observados microscopicamente e aqueles identificados através do método molecular.

Os resultados do DGGE em conjunto com os resultados do balanço de massa do enxofre elementar, indicaram que o sulfeto presente no efluente anaeróbio foi oxidado biologicamente e convertido em enxofre elementar e /ou a sulfato pela biomassa fototrófica que se desenvolveu nos reatores, mostrando sua capacidade de realizar fotossíntese anoxigênica.

A composição da comunidade microbiana desenvolvida em cada reator foi diferente, nos tempos de detenção hidráulica de 24h, 12h e 6h, com índices de similaridade abaixo de 60%, indicando que materiais suportes diferentes favoreceram a formação de comunidades microbianas distintas. Uma vez que a biomassa do reator R1 na condição operacional TDH = 6h produziu maior quantidade de enxofre elementar (que saiu no efluente) com base no balanço de massa e manteve a diversidade de acordo com o índice de Shannon, pode-se concluir que o reator R1 no TDH=6h, contendo meio suporte anel plástico, foi mais apropriado para o estabelecimento de uma comunidade bacteriana envolvida na remoção biológica de sulfeto. Além disso, o potencial para formação e recuperação de enxofre elementar (3,2 g de S / m<sup>3</sup> de efluente tratado) de efluente anaeróbio com baixa concentração de sulfeto foi demonstrada.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABBATI, C.; SILVA E.L. Remoção de sulfetos em efluentes líquidos por bactérias fotossintéticas em biorreator convencional. COBEQ, p.1-6, 2008.
- ABELLA, C.A.; GIL, G. Microbial ecology of planktonic filamentous phototrophic bacteria in holomictic freshwater lakes. *Hydrobiologia*, v.243/244, p. 79-86, 1992.
- 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.
- ALBUQUERQUE, L.; RAINEY, F. A.; NOBRE, M. F.; COSTA, M.; *Hydrotalea sandarakina* sp. nov., isolated from a hot spring runoff, and emended descriptions of the genus *Hydrotalea* and the species *Hydrotalea flava*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2012), 62, 1603–1608
- AMIM, R. S. Avaliação de parâmetros cinéticos de uma cultura mista de microrganismos 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.
- APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, 2012.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. *Ecologia microbiana e microbiologia ambiental*. 3ª Edição. Madri: Pearson Education S.A., 2002.
- BERISTAIN-CARDOSO, R.B., SIERRA-ALVAREZ, R., ROWLETTE, P., FLORES, E.R., GÁMEZ, J. & FIELD, J.A. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 1148-1157, 2006.
- BITTON, G. *Wastewater Microbiology*. 3 ed. John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STAKEY, J. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. Two. The Proteobacteria – Part B: Gammaproteobacteria USA: Springer, 2005a. 1102.
- 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 Edition. USA: Springer, 2005b.
- 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.
- BRYANT, D.A.; FRIGAARD, N.-U.; Prokaryotic photosynthesis and hototrophy illuminated. *Trends Microbiol.* (November 2006). 14 (11): 488–96.
- BROWKER, R.P.G.; SMITH, J.M.; WEBSTER, N. A. *Odor e corrosion control in sanitary sewage and treatment plants*. New York: *Hemisfere Publishing Corp*, 1989.
- BUISMAN, C.J.N.; WIT, B.; LETTINGA, G. Biotechnological sulphide removal in three polyurethane carrier reactors: stirred reactor, biorotor reactor and upflow reactor. *Water Research*, v.24, n.2, p.245-251, 1990.
- CASAMAYOR, E.; SCHAFFER, H.; BAÑERAS, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MUYZER, G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Env. Microb.*, v.66, n.2, p.499-508, 2000.

- 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.
- 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.
- ELSHAHED, 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.
- ETCHEBEHERE, C.; ERRAZQUIN, I.; BARRANDEGUY, E.; DABERT, P.; MOLETTA, R.; MUXÍ, L.A. Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors FEMS Microbiol. Ecol., 35 (3) (2001), pp. 259–265
- 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.
- 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.
- FERRERA I, MASSANA R, CASAMAYOR EO, BALAGUÉ V, SÁNCHEZ O, PEDRÓS-ALIÓ C, MAS J. High-diversity biofilm for the oxidation of sulfide-containing effluents. *Appl Microbiol Biotechnol* v.64(5):726-34. Epub 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.
- GAFAN, G.P., SPRATT, D.A. Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGE) - An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities (2005) *FEMS Microbiology Letters*, 253 (2) , pp. 303-307.
- 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.
- GARCIA, G.P.P. Estudo do desempenho e da comunidade microbiana de biorreator tratando efluente anaeróbio contendo sulfeto. Tese de Belo Horizonte, 2014, 138 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- GENTIL, VICENTE. Corrosão. 3. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. 1996
- 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.
- GRAAFF, M.; KLOK, J.B.; BIJMANS, M.F.M.; MUYZER, G.; JANSSEN, A.J.H. Applications of a 2-step process for the biological treatment of sulfidic spent caustics. *Water Research*, v. 46, p.723-730, 2012.
- HANSEN, T. A. & VAN GEMERDEN, H. Sulfide utilization by purple non-sulfur bacteria. *Biochimica et Mikrobiologie* (1972). 86, 49-56.



- 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.
- HIRASAWA, J.S. Avaliação de metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de Biologia Molecular. 114f. Tese de Doutorado em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- HOLMER, M e STORKHOLM, P. Sulphate reduction and sulphur cycling im lake sediments. *Freshwater biology*, v.46, p.431-451, 2001.
- HOLT, JOHN G. Bergey's manuel of determinative bacteriology, 9 eddition. Baltimore: Williams & Williams, 1994.
- 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.
- 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.

- KIRCHMAN D. L. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microb. Ecol.* 2002. 39:91-100.
- 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.
- 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.
- 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 NO<sub>2</sub> removal. *Clean Techn. Environ. Policy*, v. 7, 285-293, 2005.
- 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.
- LARIMER, F.W., CHAIN, P., HAUSER, L., LAMERDIN, J., MALFATTI, S., DO, L., LAND, M.L., PELLETIER, D.A., BEATTY, J.T., LANG, A.S., TABITA, F.R., GIBSON, J.L., HANSON, T.E., BOBST, C., TORRES Y., TORRES, J.L., PERES, C., HARRISON, F.H., GIBSON, J., HARWOOD, C.S. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology*. Volume 22, Issue 1, January 2004, Pages 55-61.
- LAUREN, N.R.; WATKINSON, J.H. Elemental sulphur analysis using high-performanceliquid 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.
- LUO, Y.H. e MITSUI, A. Sulfide as electron source for H<sub>2</sub>-photoproduction in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain Miami BG 043511, under stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v.35, p.203-207, 1996.

- 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.
- MANSKE, A.; GLAESER, J.; KUYPERS, M.M.M.; OVERMANN, J. Physiology and phylogeny of green sulfur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the black sea. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.12, p. 8049-8060, 2005.
- 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.
- MAINTINGUER, S. I.; SAKAMOTO, I. K.; ADORNO, M. A. T. and VARESCHE, M. B. A. Evaluation of the microbial diversity of denitrifying bacteria in batch reactor. *Braz. J. Chem. Eng.*[online]. 2013, vol.30, n.3, pp. 457-465. ISSN 0104-6632.
- 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.
- 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.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.
- NEUTZLING, O., PFLEIDERER, C., TRUPER, H. G.. Dissimilatory Sulphur Metabolism in Phototrophic "Non-sulphur". *Bacteria Journal of General Microbiology* (1985), 131, 791-798.
- NOYOLA, A.; MORGAN-SAGASTUME, M. J.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. E. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy/resource recovery. *Environmental Science and Technology*, 5, p 93-114, 2006.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. H<sub>2</sub>S 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.

- 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.
- RAMOS, I.; PEREZ, R.; FDZ-POLANCO, M. Microaerobic desulphurisation unit: A new biological system for the removal of H<sub>2</sub>S from biogas. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 633-40, Aug 2013. ISSN 0960-8524.
- RAMOS, I; PÉREZ, R; FDZ-POLANCO, M. The headspace of microaerobic reactors: Sulphide-oxidising population and the impact of cleaning on the efficiency of biogas desulphurisation. *Bioresource technology*, v. 158, p. 63–73, abr. 2014.
- RAVEN, H.P.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. 8 ed. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara Koogan, 2007. 830p.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes dedesnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: *Genética e melhoramento de microrganismos*. Mello, I.S. (ed). EdUSP, São Paulo, pp.97-129, 2002.
- 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.
- 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.
- SILVA, S. Q.; ZERBINI, A.M ; GODINHO, V.M. ; CHERNICHARO, C.A.L . Caracterização morfológica de microrganismos presentes em espuma de reatores UASB tratando esgotos domésticos. In: *23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária*, 2005, Campo Grande. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária, 2005.
- 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.
- SOUZA, L. C. Estudo quantitativo e qualitativo de espuma acumulada em reatores UASB tratando esgotos domésticos. 130f. Dissertação de Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 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.

- THOMAS, F.; HEHEMANN, J-H.; REBUFFET, E.; CZJZEK, M.; MICHEL, G. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection . *Frontiers in Microbiology* 2011;2:93. doi:10.3389/fmicb.2011.00093.
- TORRES, P. Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário sob diferentes condições de operação. Dissertação de Mestrado – SHS-EESC-USP, São Carlos, 1992.
- TORTORA, G. J.; FUNKI, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*, 6º edição. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- [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.
- VISSER, A.; GAO, Y.; LETTINGA, G. Effects of short term temperature increases on the mesophilic breakdown of sulfate-containing synthetic wastewater. *Water Research*, v.27, p. 541-556, 1995.
- VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W.B. (September 15, 2009) [1984(Williams & Wilkins)]. George M. Garrity, ed. *The Firmicutes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 3* (2nd ed.). New York: Springer. p. 1450.
- 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.
- WEF; ASCE. *Odor control in wastewater treatment plants*. New York, 1995. 282 p.
- 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.
- 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.

