

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

JANAINA ILTCHENCO

**USO DO SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO
PARA CARACTERIZAR COMUNIDADES MICROBIANAS
ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE METANO E COPRODUTOS
A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA**

Caxias do Sul
2017

JANAINA ILTCHENCO

**USO DO SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO
PARA CARACTERIZAR COMUNIDADES MICROBIANAS
ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE METANO E COPRODUTOS
A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA**

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais da Universidade de Caxias do Sul, como requisito parcial para a obtenção de grau de mestre em Engenharia e Ciências Ambientais, orientada pela Professora Dra. Suelen Osmarina Paesi e coorientada pela Professora Dra. Eloane Malvessi.

Caxias do Sul
2017

I29u Ilitchenco, Janaina

Uso do sequenciamento de alto desempenho para caracterizar comunidades microbianas envolvidas na produção de metano e coprodutos a partir da digestão anaeróbia da vinhaça / Janaina Ilitchenco. – 2017.

91 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais, 2017.

Orientação: Suelen Paesi.

Coorientação: Eloane Malvessi.

I. vinhaça, biogás, consórcios, arqueas, metabarcoding. I. Paesi, Suelen, orient. II. Malvessi, Eloane, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“USO DO SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO PARA CARACTERIZAR COMUNIDADES MICROBIANAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE METANO E COPRODUTOS A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DA VINHAÇA.”

Janaina Itchenco

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo colegiado do programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciências Ambientais da Universidade de Caxias do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia e Ciências Ambientais, com Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental.

Caxias do Sul, 23 de Junho de 2017.

Banca Examinadora:

Dra. Suelen Paesi
Orientadora
Universidade de Caxias do Sul

Dra. Eloane Malvessi
Coorientadora
Universidade de Caxias do Sul

Dr. Lademir Luiz Beal
Universidade de Caxias do Sul

Dra Juliana Calabria
Universidade Federal de Minas Gerais

Dra Raqueli Teresinha França
Universidade de Caxias do Sul

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

A minha orientadora Suelen Paesi e coorientadora Eloane Malvessi pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e auxílio no andamento do projeto.

Aos meus colegas do Laboratório de Diagnóstico Molecular, especialmente: Caroline Damin Leite, Flaviane Eva Magrini, Liliane Poletto, Leandro Gois de Almeida e os outros colegas, por me auxiliarem diretamente nesse projeto.

Ao professor Lademir Luiz Beal, pela oportunidade de ingressar no projeto Biogás, com o apoio da PETROBRAS, e por me proporcionar esse aprendizado que vou levar para toda a vida.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Ambiental e equipe do projeto Biogás: Juliane, Vanessa, Leticia, Vânia e Camila pela parceria.

A professora Juliana Calabria e a laboratorista Cintia Dutra Leal por me oportunizar um estágio na UFMG, onde pude agregar conhecimentos e contribuições ao meu trabalho.

A pesquisadora Adriana Giongo, do Instituto de Petróleo da PUC, pelo auxílio nas análises de amostras.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Engenharias, por todo o conhecimento transmitido ao longo deste período.

Ao meu pai Artêmio Itchenco por me apoiar nas minhas decisões e por estar ao meu lado em todas as horas.

A Deus, pela saúde, pela minha vida, por me oportunizar escolhas.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 ETANOL	15
3.2 VINHAÇA	17
3.3 BIOGÁS	19
3.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA	20
3.4.1 <i>Hidrólise</i>	21
3.4.2 <i>Acidogênese</i>	22
3.4.3 <i>Acetogênese</i>	23
3.4.4 <i>Metanogênese</i>	23
3.4.5 <i>Arqueas</i>	24
3.5 MICROBIOLOGIA DO LODO GRANULAR	25
3.6.1 Metodologia de identificação de microrganismos por PCR	27
3.6.2 Identificação de microrganismos por DNA Barcoding	28
4 METODOLOGIA	30
4.1 INÓCULO	30
4.2 MEIOS DE CULTIVO	30
4.3 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE FERMENTAÇÃO	30
4.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS RELATIVAS AOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO	32
4.4.1 Determinação de ácidos graxos voláteis	32
4.4.2 Determinação de biomassa e carboidratos totais	32
4.4.3 Análise da composição e volume de biogás na fermentação	33
4.5 MEIOS NUTRITIVOS PARA ENRIQUECIMENTO DO INÓCULO	33
4.5.1 Solução traço de metais	33
4.5.2 Solução de resazurina e de vitaminas	34
4.6 MÉTODOS MOLECULARES	35
4.6.1 Extração de DNA	35
4.6.2 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)	35
4.6.3 Sequenciamento de alto desempenho (<i>metabarconding</i>)	35
4.6.4 Análise do sequenciamento de alto desempenho	36
5 RESULTADOS	37

5.1 Capítulo 1. Estudo comparativo do uso de meios nutritivos para otimização na produção de biogás	38
5.2. Capítulo 2. Análise da produção de biogás em batelada sob condição mesofílica, a partir da vinhaça de cana de açúcar, sem e com ambientação prévia do inóculo e identificação da microbiota presente em biorreator com melhor produção de metano.	45
5.3 Capítulo 3 Sequenciamento de alto desempenho como ferramenta para a identificação de bactérias e arqueas responsáveis pela produção de biogás a partir de vinhaça	62
6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	81
REFERÊNCIAS.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGV – Ácidos Graxos Voláteis

CH₄- Metano

CO₂ – gás carbônico

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DQO – Demanda Química de Oxigênio

OTU – Unidade Taxonômica Operacional

pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RNA_r – Ácido ribonucleico ribossômico

S₀ – Substrato inicial

X₀ – Biomassa inicial

ΔG° – energia livre de Gibbs

mmol – milimol

16S – região conservada (bactérias)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Produção de etanol no Brasil, no período de 2010 a 2017.....	12
Tabela 2 Parâmetros bioquímicos relacionados a vinhaça.....	26
Tabela 3 Composição do meio basal Zinder.....	29
Tabela 4 Composição da solução traço de metais Zinder.....	29
Tabela 5 Composição da solução de vitaminas para o crescimento de arqueas metanogênicas.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxo da produção de etanol de cana-de-açúcar.....	14
Figura 2 Classificação dos domínios Bacteria, Archaea e Eucarya	23
Figura 3 Sequência de etapas na Digestão Anaeróbia	20
Figura 4 Estrutura multicamada do grânulo anaeróbio	26
Figura 5 Fluxograma representando as etapas para o sequenciamento de alto desempenho	29

RESUMO

A vinhaça é um resíduo resultante da produção de etanol gerada em grande quantidade no Brasil, e pode ser aproveitada para produção de biogás. Diversos microrganismos atuam na degradação da vinhaça para obtenção de biogás, e o estudo desses consórcios microbianos é imprescindível para que haja otimização desse processo. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a produção de metano e coprodutos a partir da vinhaça, bem como identificar bactérias e arqueas envolvidas na produção de metano por sequenciamento de alto desempenho. Inicialmente, verificou-se a potencialidade de enriquecimento do inóculo na produção de biogás. A produção de metano foi avaliada com meio Zinder e Meio Monteggia com e sem acetato, e posteriormente foram feitos testes com prévia ambientação do inóculo proveniente de estação de tratamento de óleo vegetal e vinhaça. Concomitante, foram feitos experimentos em reator de 5L, com diferentes (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; e 1,7), nas quais foram coletadas amostras de gás e líquidas para análises de produção de metano, ácidos graxos voláteis, remoção de DQO e identificação de microrganismos. Verificou-se que a adição de acetato aos meios nutritivos proporcionou a produção de 5,9 mmol/CH₄ com meio Zinder. O bioensaio sem enriquecimento destacou-se conforme relação S₀/X₀=1,5 que produziu 12,48 mmol de CH₄. Em todos os bioensaios houve produção de ácido acético, propiônico e valérico, e a maior produção de ácidos ocorreu na relação S₀/X₀=1,7 com enriquecimento na ambientação do inóculo, onde foi produzido 115mg.L⁻¹ de ácido acético, 195 mg.L⁻¹ de ácido propiônico e 154 mg.L⁻¹ de ácido butírico. A microbiota da relação S₀/X₀=1,5 mostrou a predominância de bactérias dos filos Bacteroidetes (49,92%), Firmicutes (12,02%) e Proteobacteria (11,23%). Os gêneros *Bacteroides*, OTU pertencente à Família *Porphyromonadaceae*; e arqueas *Methanobacterium*, *Methanosaeta* e *Methanosarcina* foram os predominantes. No experimento em maior escala (5L), a microbiota foi avaliada conforme relação S₀/X₀=1,7, destacando-se filos Bacteroidetes (22,63%), Euryarchaeota (19,94%) e Firmicutes (16,33%); gênero *Methanosaeta* (15%), microrganismo da família *Porphyromonadaceae* (13,54%) e *Candidatus Cloacamonas*, (9,36%) na amostra do pico de produção. As arqueas encontradas nas amostras foram: *Methanobacterium* sp., *Methanomas* sp., *Methanosaeta* sp., *Methanomassiliicoccus* sp, e microrganismos da ordem Methanobacteriales. A vinhaça mostrou um grande potencial para produção de metano, e uma vasta diversidade microrganismos identificados que auxiliam no entendimento e otimização do processo.

Palavras-chave: Vinhaça, biogás, consórcios, arqueas, metabarcoding.

ABSTRACT

Vinasse is a residue resulting from the production of ethanol generated in large quantities in Brazil, and can be approved for biogas production. Several microorganisms act in the degradation of the vinasse to obtain biogas, and the study of microbial consortia is essential for optimization of the process. This work aimed to evaluate the production of methane and co-products from the vinasse, as well as to identify bacteria and archaea involved in the production of methane by high performance sequencing. Initially, the potential of enrichment of the inoculum in biogas production was verified. The methane production was evaluated with Zinder medium and Monteggia medium with and without acetate, and later it has tests with previous environment of the inoculum coming from the treatment plant of vegetable oil and vinasse. Concomitant experiments were carried out in a 5L reactor, with different samples (0,25; 0,5; 0,75; 1,0 ; 1,25; 1,5 and 1,7), in which gas samples were collected and liquid for analysis of methane production, volatile fatty acids, removal of COD and identification of microorganisms. It was found to be an addition of acetate to the nutrient media yielding the production of 5.9 mmol / CH₄ with Zinder medium. The bioassay without enrichment was highlighted according to the ratio $S_0/X_0 = 1,5$ which produced 12,48 mmol/CH₄. In all bioassays, acetic, propionic and valeric acids were produced, and the highest acid production in relation to $S_0/X_0=1,7$ was obtained with enrichment in the inoculum environment, where 115mg.L⁻¹ acetic acid, 195 mg.L⁻¹ of propionic acid and 154 mg.L⁻¹ of butyric acid. A microbiota of the $S_0/X_0=1.5$ ratio showed a predominance of bacteria of the phyla Bacteroidetes (49.92%), Firmicutes (12,02%) and Proteobacteria (11,23%). The genera Bacteroides, OTU belonging to the Porphyromonadaceae Family; and archaea Methanobacterium, Methanosaeta and Methanosarcina were the predominant. Bacteroidetes (22,63%), Euryarchaeota (19,94%), and Firmicutes (16.33%) were the most important ones, with a larger scale (5L), a microbiota evaluated according to $S_0/X_0 = 1,7$; genus Methanosaeta (15%), microorganism of the family Porphyromonadaceae (13,54%) and Candidatus Cloacamonas, (9,36%) in the sample of the peak of production. As archaea found in the samples were: Methanobacterium sp., Methanomas sp., Methanosaeta sp., Methanomassiliicoccus sp, and microorganisms of the order Methanobacteriales. A vinasse showed great potential for methane production, and a wide diversity of microorganisms identified that help in the understanding and optimization of the process.

Keywords: Vinasse, biogas, consortia, archaea, metabarcoding

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o líder na produção de etanol de cana-de-açúcar e tem se destacado, desde a década de 1970, pelo programa de produção de etanol (PROALCOOL) (KOHLHEPP, 2010). Sendo um combustível derivado de matéria-prima renovável, proporcionou uma maior flexibilidade da indústria brasileira com respeito à gestão da matriz energética, especialmente em períodos de instabilidade da oferta de petróleo no mercado mundial, além da possibilidade de servir como base para a obtenção de diversos produtos químicos.

A vinhaça é um resíduo da produção de etanol, gerada em grande quantidade, que possui elevadas concentrações de nitrato, potássio e matéria orgânica (SILVA, GRIEBELER, BORGES, 2007). É utilizada como fertilizante para a agricultura, principalmente canaviais, e para a obtenção de biogás. Se descartada inadequadamente pode causar danos ao meio ambiente como desertificação do solo e poluição de lençóis freáticos, podendo tornar uma grande área improdutiva e causando prejuízos à economia nacional. Diante do grande volume produzido a cada safra de cana-de-açúcar, impõe-se a necessidade de que sejam buscadas outras aplicações para este material.

A digestão anaeróbia resulta na produção do biogás, que é uma mistura de gases (metano, gás carbônico, gás sulfídrico, amônia e hidrogênio), podendo ser purificado a biometano, e utilizado como biocombustível, em substituição aos combustíveis fósseis. O processo da biodigestão em reatores é complexo e depende da disponibilidade de alimento e da população de microrganismos, portanto a concentração inicial de substrato por unidade de massa dos microrganismos (relação S_0/X_0) está relacionada com a eficiência do sistema.

A identificação dos microrganismos que atuam no processo fermentativo é uma etapa de extrema importância, assim como a avaliação de parâmetros do processo de produção de biogás. Metodologias de identificação molecular são requeridas para caracterizar grupos que convivem em associação no contexto global do processo fermentativo. O sequenciamento de alto desempenho (*metabarcodings*) é uma técnica atualmente utilizada para identificação de microrganismos de amostra ambiental.

Neste contexto, este trabalho tem como foco a identificação e caracterização de bactérias e de arqueas provenientes do lodo de estação de tratamento de efluentes de óleo vegetal, capazes de metabolizar a vinhaça visando à obtenção de metano e outros subprodutos (tais como ácido acético, propiônico, butírico, valérico) da fermentação além de verificar a produção de metano em batelada, em meios com adição de vinhaça, com inóculo enriquecido e sem enriquecimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar as comunidades microbianas envolvidas na produção de metano e outros coprodutos a partir da degradação anaeróbia da vinhaça.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

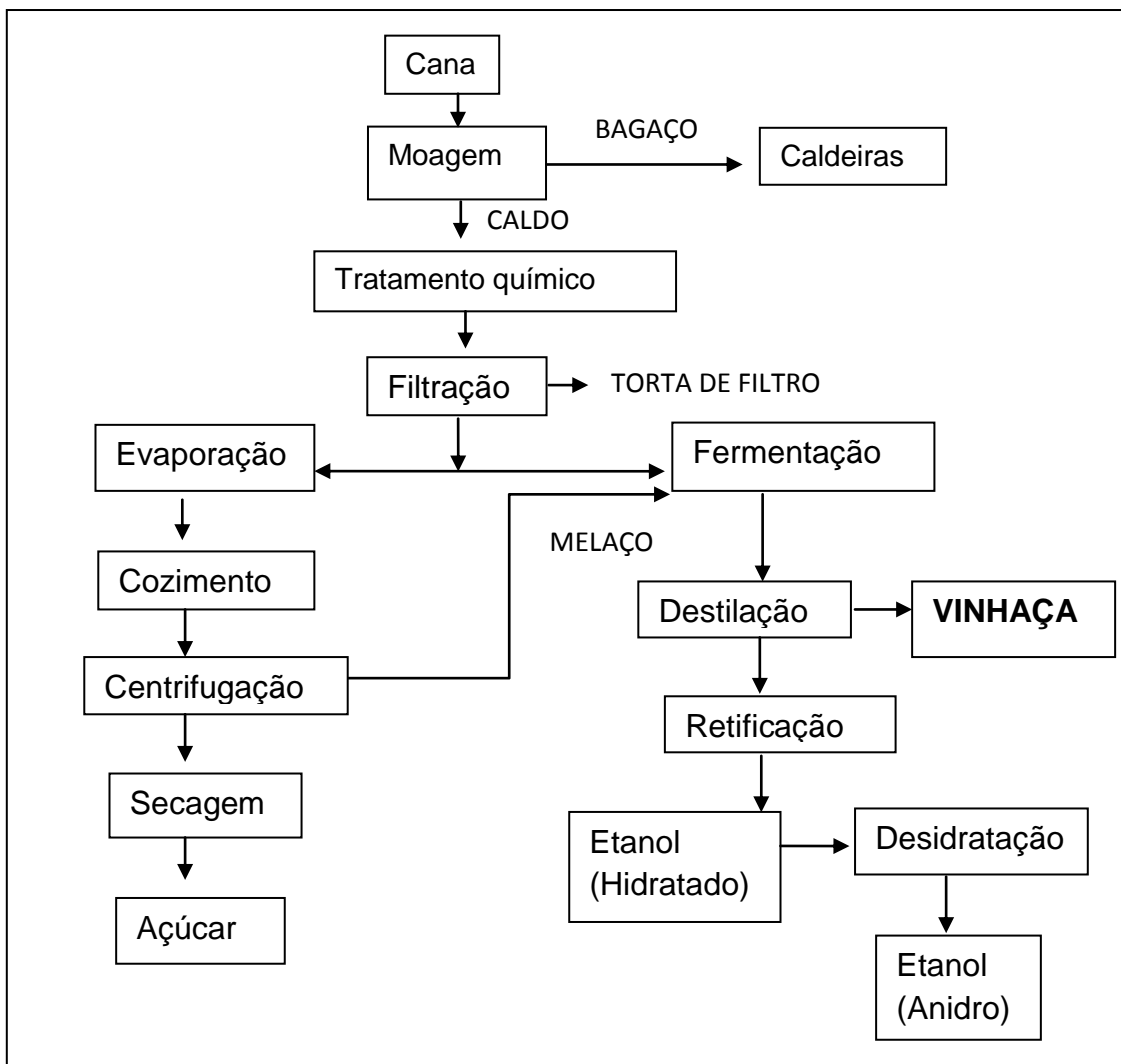
- Verificar a potencialidade do enriquecimento do inóculo a partir de meio basal *Zinder* e meio *Monteggia*, com e sem adição de acetato de sódio.
- Analisar a produção de metano em batelada, em meios com adição de vinhaça através de diferentes relações substrato/biomassa ($S_0/X_0 = 0,5; 1; 1,5$ e $1,7$) utilizando inóculo pré-ambientado com meio *Zinder*, e sem enriquecimento.
- Identificar bactérias e arqueas presentes em amostras de reatores de bancada com a melhor produção de metano, por PCR e sequenciamento de alto desempenho (*metabarcoding*).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ETANOL

O etanol é um biocombustível produzido através de matéria prima com alto teor de glicose, como: cana-de-açúcar, mandioca, milho, batata-doce, do babaçu e de outros produtos de elevada importância econômica para o país (ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009). O processo de produção de etanol inicia com a colheita da cana-de-açúcar, que é transportada para o processo de moagem onde é produzido o caldo de cana (Figura 1).

Figura 1: Fluxo da produção de etanol de cana-de-açúcar (Fonte: SEABRA, 2008).



O caldo de cana é peneirado e tratado para coagulação, floculação e precipitação de impurezas, que são eliminadas por decantação, e o bagaço é transportado para as caldeiras, onde é queimado para gerar vapor. O caldo tratado é concentrado em evaporadores e cozedores para cristalização da sacarose. O caldo restante passa pela calagem, aquecimento e decantação. Após é evaporado e misturado com o melão, originando o mosto, uma solução pronta para ser fermentada. Na destilação, o bioetanol é recuperado na forma hidratada, de onde resulta a vinhaça ou vinhoto como resíduo numa proporção média de 8 a 18 litros por litro de etanol produzido (FERREIRA et al., 2011).

O governo brasileiro instituiu, na década de 70, o Proálcool (Programa Nacional do Álcool), um programa de substituição em larga escala de combustíveis veiculares derivados do petróleo, que causou a aceleração na produção e incentivou produtores de etanol (GRANATO, 2003). Na década seguinte, com a grande demanda de carros movidos a etanol houve uma expansão dos canaviais, porém com grandes impactos ambientais como desmatamento, queimadas, poluição de lençóis freáticos e águas superficiais (SZMRECSANYI, 1994; ROSSETO, 2010).

Entre os anos de 2011-2012, o Brasil passou a ser reconhecido como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo processado 559 milhões de toneladas, sendo que aproximadamente 51,6% deram origem ao etanol, e os 48,4% restantes foi produzido o açúcar (POSSIGNOLO et al., 2015). A região brasileira com a maior produção de etanol é a região sudeste, contemplando 17.104,98 m³ de etanol em 2016. O total de produção de etanol no Brasil, em 2016 foi de 28.692,67m³ (Tabela 1).

Tabela 1: Produção de etanol no Brasil, no período de 2010 a 2017 (m³)

Meses/Ano	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Janeiro	357.769	312.568	326.507	406.931	508.790	309.142
Fevereiro	271.719	184.483	239.192	328.086	340.918	261.214
Março	240.363	213.899	371.316	512.877	918.474	637.918
Abril	580.224	1.571.950	1.579.617	1.853.676	2.775.815	1.728.238
Mai	2.119.256	3.244.127	3.255.035	3.056.215	3.270.914	2.862.788
Junho	2.259.493	2.862.410	3.645.531	3.708.795	3.216.114	3.459.114
Julho	3.467.460	3.807.840	3.514.138	3.670.779	4.128.533	-
Agosto	3.870.228	4.087.846	4.380.490	4.615.080	3.866.658	-
Setembro	3.519.969	3.682.777	3.730.303	3.808.490	3.686.019	-
Outubro	3.416.354	3.364.246	3.855.540	3.930.277	3.085.005	-
Novembro	2.448.854	2.774.333	2.215.008	2.468.883	2.030.618	-
Dezembro	1.239.272	1.430.646	1.047.617	1.656.204	864.815	-
Total (m³/ano)	23.790.961	27.537.124	28.160.295	30.016.294	28.692.674	9.258.413

*Fonte ANP, 2017.

O uso de biocombustíveis está cada vez mais difundido e a aposta mundial é a ampliação da produção e do consumo do etanol. Com isso, há necessidade de utilização para coprodutos gerados na produção deste biocombustível.

3.2 VINHAÇA

A vinhaça apresenta coloração marrom escura, pH ácido (3,5 a 5,0), elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (SATYAWAL e BALAKRISHANAN, 2008). Em função da elevada temperatura na saída dos destiladores, em torno de 70 a 80°C, esse efluente consiste em uma ameaça ao meio ambiente se disposto de maneira inadequada (FREIRE e CORTEZ, 2000; SILVA *et al*, 2007).

A vinhaça é considerada um resíduo sólido pela NBR 10.004 da ABNT (2004), pois não há solução convencional para seu tratamento como despejo nos padrões exigidos pela lei. Órgãos estaduais de proteção ambiental intensificaram a homologação de legislações específicas que impõem restrições para a aplicação de vinhaça no solo agrícola, especialmente em áreas de recarga do aquífero ou em áreas próximas a cursos de água, para impedir que haja saturação do solo agrícola com íons presentes na vinhaça que não formam compostos inertes e são lixiviados para camadas profundas do solo, podendo atingir o lençol freático (SALOMON, 2007).

A composição química da vinhaça está relacionada a fatores como: a natureza e composição da matéria prima, sistema usado no preparo do mosto, método de fermentação adotado, sistema de condução da fermentação alcoólica, espécie da levedura utilizada, tipo de destilador e modo destilação empregada (FREIRE e CORTEZ, 2000).

A fertirrigação é reconhecida como a solução para o problema do direcionamento deste subproduto, porém, o nitrogênio presente na sua composição química pode infiltrar no solo atingindo camadas profundas até o lençol freático, isto acontece quando numa única área é dosada uma quantidade superior a 400 m³ de vinhaça por hectare (PINTO, 1999).

Quando a vinhaça é aplicada em doses elevadas, pode resultar em efeitos indesejáveis como o comprometimento da qualidade da cana para produção de açúcar, o aumento de salinização do solo e poluição do lençol freático, resultado da biolixiviação de compostos (SILVA et al., 2007; CORAZZA, 2006). Porém, a prática da fertirrigação pode fazer com que os nutrientes e a matéria orgânica atinjam as águas superficiais acidentalmente através de vias de armazenamento e transporte da vinhaça, representando um perigo para a qualidade das águas superficiais (GUNKEL et al., 2007). Ramana et al. (2002) observou decréscimo da taxa de germinação das sementes em cinco culturas (tomate, cebola, pimentão, abóbora e pepino), com vinhaça em concentração acima de 50% aplicada ao solo.

A vinhaça pode ser utilizada na forma concentrada, por evaporação, onde o produto obtido é utilizado na produção de alimentos para animais, na própria vinhaça para melhorar a qualidade como fertilizante, pode ser queimado em caldeiras especiais gerando energia ou diminuindo o uso de água na instalação, e o condensado removido por evaporação pode ser tratado e reutilizado (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Entre os dejetos de alto potencial poluidor, encontra-se a vinhaça, devido a características como baixo pH e elevada demanda química de oxigênio (DQO), bem como elevado teor de matéria orgânica coloidal que leva a oxidação de todo o oxigênio disponível na água (DAMIANO, 2005 apud RODRIGUES et al., 2012).

Em diferentes estudos, é possível verificar alterações do solo por meio da vinhaça. Madejón et al. (2001) observaram pequena elevação em sua salinidade,

elevação no conteúdo de matéria orgânica e no nitrogênio total, em trabalho com associação de vinhaça e outros materiais orgânicos no condicionamento do solo. Pode-se esperar um aumento na concentração de sais no solo e potencial risco de salinização com a aplicação de vinhaça a longo prazo, considerando-se a taxa de absorção de potássio pela planta, sua concentração na vinhaça e a baixa condutividade elétrica observada no lençol freático, indicativo de reduzida lixiviação (LYRA et al., 2003).

3.3 BIOGÁS

O biogás é uma mistura de gases, produzido durante a digestão anaeróbia da matéria orgânica, composto por CH₄ (40-70%), CO₂ (25 a 30%), e outros (RASI, 2009). Pode ser considerado uma fonte estratégica de energia, e um importante agente na ampliação da geração de energia elétrica distribuída no país, com base em fontes limpas e renováveis, bem como substituir o gás natural derivado do petróleo.

As aplicações energéticas do biogás mais difundidas são: a utilização como combustível em caldeiras, fornos, estufas, geração de eletricidade, injeção na linha de gás natural e como combustível veicular. Pode ser utilizado, também em pequena escala, para aquecimento e cocção e em grande escala como aproveitamento de sistemas de cogeração, reduzindo assim o consumo de combustíveis fósseis (ZANETTE, 2009). Pode ser aproveitado na indústria sucroalcooleira para geração de vapor e acionamento da moagem da cana, em substituição aos combustíveis utilizados na agroindústria durante o período da safra, para acionar uma turbina a gás conjugada a um gerador elétrico (GRANATO, 2003).

Verifica-se que embora haja um potencial de aproveitamento decorrente do volume elevado de biogás proveniente de esgotos gerados, principalmente nas metrópoles, são poucos os projetos de aproveitamento do biogás em operação no Brasil e em vários países do mundo, com destaque para os Estados Unidos, Canadá e alguns centros europeus (TETRPLAN, 2012).

Dentre as razões pelas quais os biocombustíveis foram adotados em países desenvolvidos estão: a redução das emissões em comparação com os combustíveis fósseis, desenvolvimento de uma nova atividade atrativa para o setor agrícola e

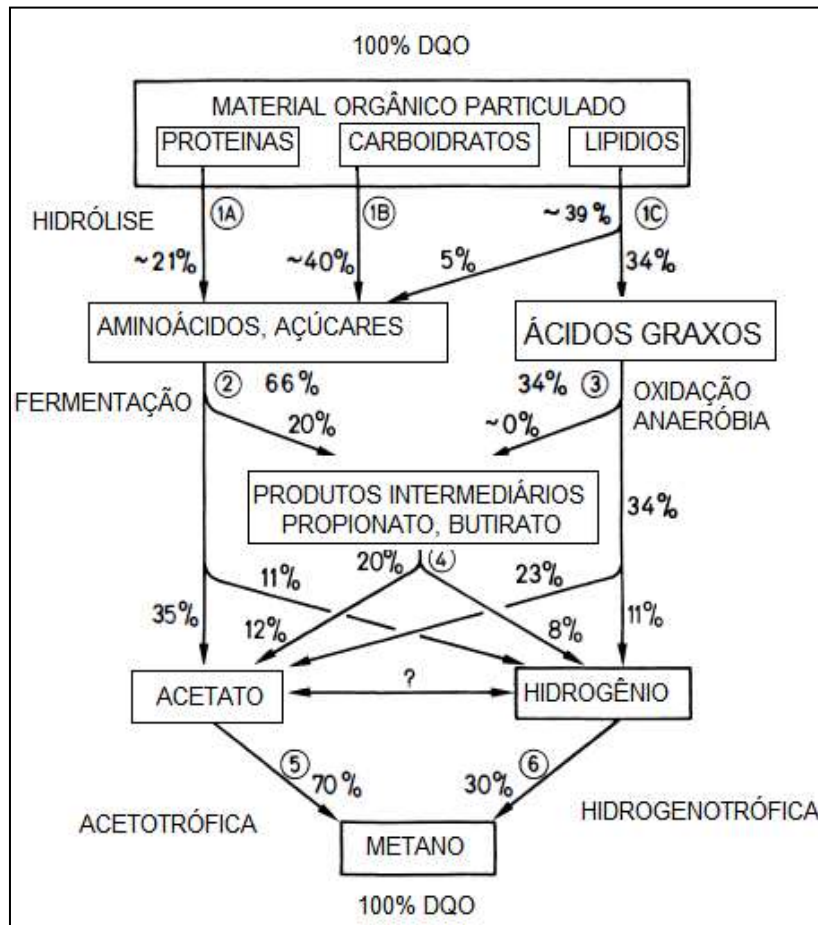
redução da dependência de combustíveis fósseis importados (LAGO et al., 2012). A maioria dos países promove ações para aumentar a participação de energias alternativas renováveis em suas matrizes energéticas, para reduzir o uso de derivados do petróleo e diminuir a emissão de poluentes. (CORTEZ et al., 2008).

3.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia é um processo comum na natureza que ocorre em pântanos, fundos de lagos, esterqueiras e no rúmen de animais ruminantes; capaz de degradar a matéria orgânica, produzindo metano e dióxido de carbono na ausência de oxigênio (RODRIGUES, PEREZ, ROMERO, 2013). Estudos apontam como vantagens da digestão anaeróbia, com relação aos combustíveis derivados do petróleo, e utilizando resíduos agroindustriais: alta redução de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), produção de biofertilizante, pequena produção de lodo, baixos custos operacionais e de investimento e possibilidade de sistemas descentralizados de tratamento de resíduo (OLIVEIRA et al., 2004).

As principais etapas da digestão anaeróbia para produção de metano são: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 2). Essa rota é para degradação de esgoto, e pode variar para outros resíduos.

Figura 2. Sequência de etapas na Digestão Anaeróbia (GUJER e ZEHNDER, 1983 apud BEAL, 2004).



3.4.1 Hidrólise

A hidrólise corresponde à primeira fase da digestão anaeróbia da matéria orgânica, onde substâncias poliméricas (carboidratos, proteínas e lípidos) são quebradas em moléculas menores, como açúcares, aminoácidos e ácidos gordos de cadeia longa (GONÇALVES, 2012). Conforme Chernicharo (2007), citado por Godoy (2013, p-8), esse processo de hidrólise ocorre por meio da ação de exoenzimas excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas.

Os carboidratos, proteínas e lípidos, bem como o material inerte particulado e solúvel são os produtos da degradação. Os monossacarídeos, os aminoácidos, os ácidos graxos de cadeia longa e o glicerol são os produtos da degradação

enzimática de carboidratos, proteínas e lipídios particulados, respectivamente, e os microrganismos se beneficiam dos produtos solúveis e produzem as enzimas hidrolíticas correspondentes (VAVILIN et al., 2008).

3.4.2 Acidogênese

Os ácidos graxos voláteis (AGVs) são produtos intermediários importantes no processo de digestão anaeróbia, e suas concentrações afetam a eficiência da fermentação. A interação sintrófica entre arqueas metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato ou microrganismos consumidores de acetato e hidrogênio, é necessária para que haja a oxidação de propionato e butirato a acetato, CO₂, H₂ e formiato (ABREU, 2007). Um fator como o aumento na carga orgânica de alimentação pode provocar o acúmulo de AGVs no reator.

O acúmulo de ácidos orgânicos inibe a decomposição desses mesmos ácidos pelas metanogênicas, conduzindo falhas no processo de digestão. Assim, a digestão anaeróbia é um processo instável, e um alto nível de atividade metanogênica contínua é necessário para o funcionamento dos digestores anaeróbios (BOONE, 1993).

Dentre os gêneros de bactérias acidogênicas mais comuns em reatores anaeróbios estão *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, e *Escherichia*. Estima-se que este grupo ocorra em reatores anaeróbios em uma densidade que varia de 10⁶ a 10⁸ células por mL de lodo (ARCHER; KIRSOP, 1990).

A conversão de propionato e butirato a CO₂ pelas bactérias redutoras de sulfato ocorre na presença de sulfato, sem a participação de metanogênicas, sendo inibida termodinamicamente pela presença de baixas concentrações de hidrogênio dissolvido e de acetato (ROEST et al., 2005; AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

Os Ácidos Graxos Voláteis são compostos intermediários importantes em processos de polimerização como no caso da produção de polihidroxialcanoatos, os chamados bioplásticos (ZEMPULSKI et al., 2014). O ácido propiônico e os seus sais de cálcio, sódio e potássio são comumente utilizados como conservantes na ração

para animais e em alimentos, além de ser um importante intermediário na síntese de fibras de celulose, herbicidas, aplicações farmacêuticas e na produção de plásticos e herbicidas (SUWANNAKHAM, 2005; HARADA, 2012). O ácido acético pode ser utilizado como intermediário químico, na produção de ácido tereftálico purificado, precursor do polímero poli tereftalato de etileno e do monômero de acetato de vinila, na produção de poli acetato de vinila (PVA) (BAIÃO, 2015).

3.4.3 Acetogênese

Na acetogênese, os ácidos e álcoois orgânicos produzidos na acidogênese são digeridos por bactérias acetogênicas para produzir principalmente ácido acético, bem como CO_2 e H_2 (APPELS et al., 2008).

Reações acetogênicas não são termodinamicamente favoráveis nas condições padrão ($\Delta G^\circ > 0$), contudo, ocorrem de forma natural em reatores anaeróbios devido à interação de microrganismos acetogênicos e metanogênicos (AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

3.4.4 Metanogênese

A metanogênese é a fase final do processo de conversão anaeróbia de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono, sendo realizada pelos microrganismos metanogênicos, os quais estão classificados dentro do domínio *Archaea*. Esses microrganismos são evolutivamente distintos das bactérias em relação à organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia (VAZOLLER, MANFIO, CANHOS, 1999).

A conversão de acetato a metano é realizada através das metanogênicas acetoclásticas que formam metano e dióxido de carbono a partir de ácido acético ou metanol. São responsáveis por cerca de 60 a 70 % de toda a produção de metano. Pertencem a dois gêneros principais: *Methanosarcina* (formato de cocos) e *Methanosaeta* (formato de filamentos).

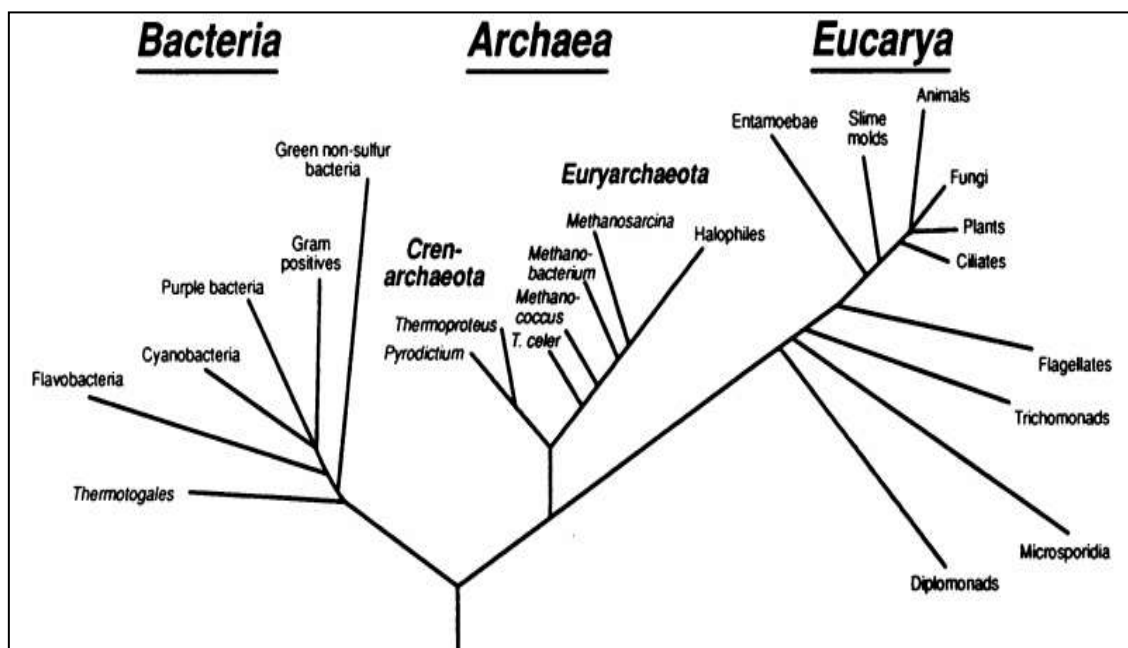
A conversão de hidrogênio a metano ocorre através das metanogênicas hidrogenotróficas que produzem metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono. Quase todas as espécies nas ordens Methanococcales, Methanobacteriales,

Methanomicrobiales e Methanopyrales são hidrogenotróficas, utilizando o H_2 e CO_2 (LEIGH et al 2011). Os gêneros mais frequentemente isolados em reatores anaeróbios são: *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter*.

3.4.5 Arqueas

Em 1977, Carl Woese propôs um modelo baseado em aspectos evolutivos a partir da comparação de sequências de rRNA, e evidência genômica e bioquímica associada (FOX; PECHMAN; WOESE, 1977). Os seres vivos classificam-se em 3 reinos ou Domínios : Bacteria, Archaea e Eucarya (Figura 3).

Figura 3: Classificação dos domínios Bacteria, Archaea e Eucarya.



*Fonte: WHEELIS, KANDLER, WOESE, 1992.

O domínio Eucarya engloba todos os organismos eucariotos, incluindo os microrganismos fungos e protozoários. As arqueas são microrganismos metabolicamente diversos, coexistindo com bactérias e eucariotos em ambientes terrestres, aquáticos e ambientes extremos com alto ou baixo pH, baixas temperaturas, alta salinidade ou pressão (ROTHSCHILD e MANCINELLI, 2001).

Apresenta cinco filos: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota, Thaumarchaeota e Aigarchaeota.

A maioria das arqueas cultivadas são extremófilas, com espécies capazes de crescer em altas temperaturas e salinidades e em pH extremos (BROCHIER-ARMANET et al. 2011). Na prática, as arqueas são estudadas e agrupadas de acordo com o seu metabolismo e fisiologia, sendo alocadas em diversos grupos, como: as metanogênicas, os halófilos extremos (ou hiperhalófilos) e os termófilos extremos (ou hipertermófilos).

Para a maioria das espécies de arqueas, uma quantidade pequena de oxigênio já é suficiente para impedir que sobrevivam. Mesmo sob essas condições, as arqueas metanogênicas não são inibidas nem cessam a sua atividade imediatamente, pois elas coexistem com bactérias aeróbias oriundas das etapas precedentes da degradação. A presença de uma comunidade microbiana diversificada é relacionada diretamente a uma maior disponibilidade de caminhos potenciais de conversões metabólicas (BRIONES e RASKIN, 2003; CARBALLA et al., 2011; PETERSON et al., 1998).

O emprego dos microrganismos metanogênicos em saneamento ambiental é amplamente conhecido e busca a mineralização anaeróbia da matéria orgânica. Porém, as perspectivas se ampliam de forma marcante, por exemplo, na bioprospecção de enzimas resistentes a condições extremas (80-100°C) presentes em *Pyrococcus* spp., *Thermococcus* spp., *Thermofilum* spp. e *Thermoproteus* spp (VAZOLLER, 1995).

3.5 MICROBIOLOGIA DO LODO GRANULAR

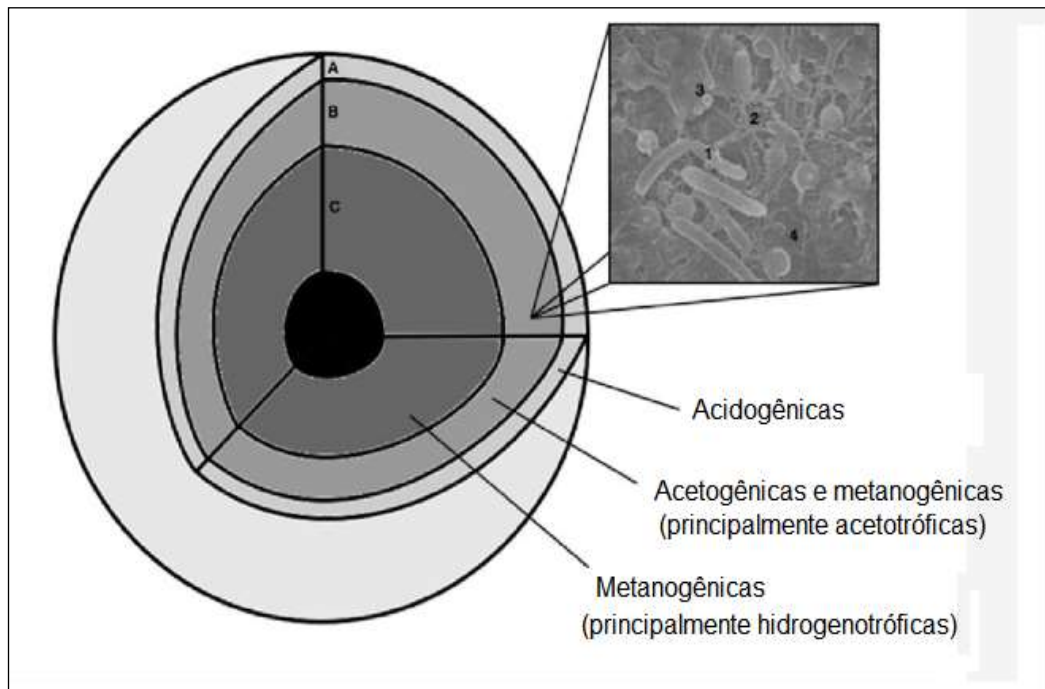
O lodo granular pode ser definido como biomassa, que tem como característica alta velocidade de sedimentação e uma alta atividade metanogênica (HULSHOFF, 1989). Os grânulos podem ser considerados como microecossistemas equilibrados, que incluem todas as espécies bacterianas necessárias para a degradação dos poluentes orgânicos presentes em águas residuais às quais está exposta (ALPHENAAR, 1994).

Em comparação com o lodo ativado, os grânulos têm um tamanho maior, estrutura mais compacta e melhor capacidade de sedimentação, que são mais

fáceis de reter altas concentrações de biomassa em reatores e para separar biomassa e sobrenadante para o bom desempenho do reator (LIU et al., 2010).

Associações sintróficas entre bactérias (Figura 4), que produzem H_2 e os microrganismos que consomem H_2 prevalecem na camada do meio (B), onde provavelmente é direcionada a transferência de elétrons interespécies, portanto pode ocorrer pelo contato direto entre células, através de nanofios, minerais, ou transportados por mediadores solúveis (DUBE e GUIOT, 2015).

Figura 4: Estrutura multicamada do grânulo anaeróbico.



*Fonte: (DUBE e GUIOT, 2015) modificado.

3.6 TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Na degradação anaeróbia de resíduos complexos, cada grupo de compostos orgânicos (proteínas, carboidratos e lipídeos) requer seu próprio grupo característico de organismos (POHLAND, 1992).

A maioria dos microrganismos não pode ser estudada através de métodos dependentes de cultivo, pois ainda não são conhecidos de forma que grande parte das pesquisas sobre diversidade microbiana atualmente são realizadas através de técnicas independentes, como a análise de genes específicos. Essas técnicas foram significativamente favorecidas com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de DNA, as quais possibilitaram o estudo em larga escala da microbiota em um determinado ambiente, além de possuírem diversas aplicações (SHOKRALLA et al., 2012).

3.6.1 Metodologia de identificação de microrganismos por PCR

A técnica de PCR permite a amplificação de genes específicos a partir de bactérias isoladas ou de bactérias não cultivadas para sequenciamento e avaliação filogenética (WARD et al., 1990; SAIKI et al., 1985). Pode-se obter a amplificação de sequências alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de sequências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas (MISSAGIA, 2010).

Para cada ciclo de replicação de DNA, ocorrem três etapas: a separação da dupla fita de DNA para exposição dos sítios-alvo a aproximadamente 94 °C (desnaturação); o anelamento dos primers, com a diminuição da temperatura, em regiões específicas de cada fita de DNA separada que serve como molde, delimitando a região inicial e final da seqüência genética a ser amplificada; e a extensão, onde ocorre a síntese de DNA complementar à fita-molde e é feita em uma temperatura em torno de 72°C (ABREU, 2007). É possível produzir milhões de cópias específicas de DNA, em poucas horas, utilizando 25 a 40 ciclos, até mesmo quando a amostra de partida contém apenas uma única seqüência alvo original (WALKER et al., 1999).

A disponibilidade de um grande número de sequências de RNAr16S depositadas em um banco de dados (*Ribosomal Data Base Project*) tem permitido que essa informação molecular seja utilizada para o agrupamento filogenético (MISSAGIA, 2010).

3.6.2 Identificação de microrganismos por DNA Barcoding

As técnicas de biologia molecular fornecem ferramentas valiosas para uma melhor compreensão das comunidades microbianas e sua função em relação a diferentes aspectos da digestão anaeróbia, que por sua vez pode ajudar a otimizar o processo de produção de biogás.

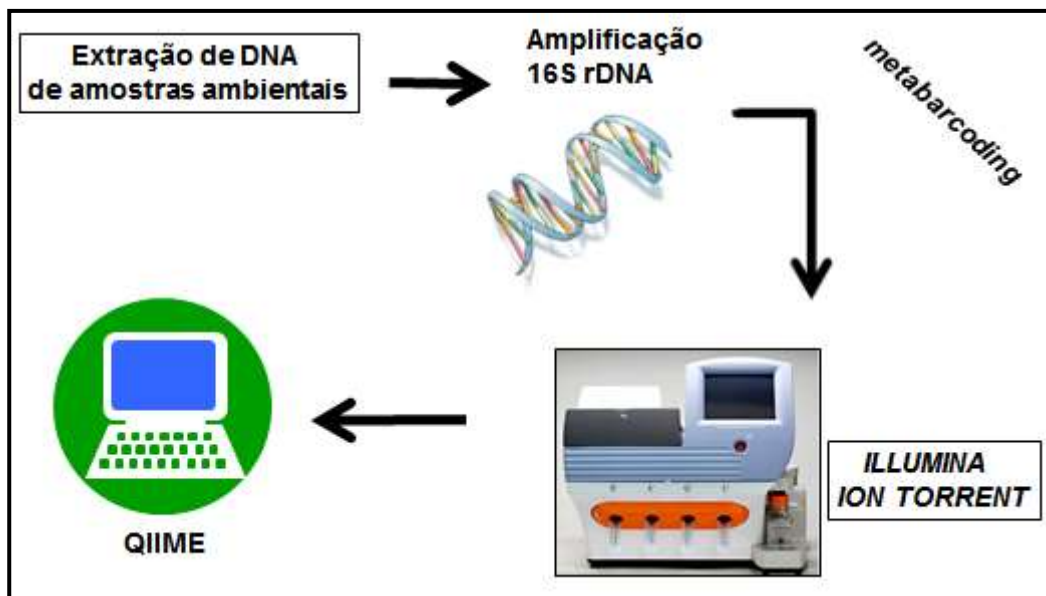
O gene 16S rRNA é muito conservado entre os domínios Bacteria e Archaea, e a identificação taxonômica é possível devido a presença de nove regiões hipervariáveis com informações para classificar os microrganismos, que possuem regiões conservadas permitindo a amplificação desse fragmento, utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais (MEDEIROS, 2016).

Abordagens genômicas do diagnóstico de táxon exploram a diversidade entre as sequências de DNA para identificar organismos, que podem ser vistas como “códigos de barras” genéticos (KURTZMAN 1994; WILSON, 1995). DNA *Barcoding* é um método rápido, preciso e padronizado para identificação a nível de espécies, usando sequências curtas de DNA, sendo uma fonte de identificação taxonômica altamente precisa (LEBONAH et al., 2014; SIDDAL et al., 2009). Esta técnica emprega regiões genômicas específicas e padronizadas de espécies (códigos de barras de DNA) para gerar bibliotecas de DNA com o objetivo primário de identificação de espécies não conhecidas. Vários genes marcadores têm sido empregados para análise de biodiversidade em diferentes profundidades filogenéticas ou em certos grupos taxonômicos. (SHOKRALLA, 2012).

O uso de sequenciamento de nova geração resulta em um robusto conjunto de dados que permite a identificação de uma grande diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas (SIMON e DANIEL, 2011). O fluxograma mostra os passos para sequenciar uma amostra ambiental. (Figura 5). Nessa técnica, a amostra é extraída utilizando primers específicos, após é feita uma biblioteca de fragmentos de DNA flanqueados pelos adaptadores Ion Torrent. As partículas revestidas com molde são aplicadas ao chip, e depositadas nos poços de microplaqueta por um curto passo de centrifugação. O chip é colocado no PGM, e é feita a execução do sequenciamento.

O método segue o princípio de um processo bioquímico, no qual um nucleotídeo é incorporado a uma cadeia de DNA e libera um íon hidrogênio como subproduto. Como consequência, o pH da solução muda e pode ser detectado diretamente pelo sensor de íons (DIAZ SANCHES et al., 2013). Assim, são geradas sequências de nucleotídeos, que são alinhados através de algoritmos para busca de banco de dados de sequências (UBLAST e USEARCH), que buscam alinhamentos locais e globais (EDGAR, 2010).

Figura 5: Etapas para o sequenciamento de alto desempenho.



Os bancos de dados genômicos representam uma das principais ferramentas de suporte para os biólogos moleculares e geneticistas. É de fundamental importância realizar cadastros de sequências, e consultas nestes bancos a fim de levantar dados para análises biológicas. Entre estas análises é possível destacar a comparação de sequências e a descoberta de novos genes, funções e características de uma nova sequência (SEIBEL, LEMOS, LIFSCHITZ, 2000).

Os sistemas de identificação microgenômicos, que permitem discriminação através da análise de um pequeno segmento do genoma, representam uma abordagem extremamente promissora (HEBERT, CYWINSKA, BALL, 2003).

4 METODOLOGIA

Para a realização desse trabalho utilizaram-se biorreatores anaeróbios em batelada, em escala de bancada, em ensaios desenvolvidos no laboratório de Diagnóstico Molecular (LDM) da Universidade de Caxias do Sul. Os procedimentos experimentais de cada etapa foram descritos neste capítulo, bem como a metodologia empregada. Foram descritos o inóculo utilizado para os bioensaios, o procedimento para enriquecimento do inóculo, os bioensaios relacionados a produção de metano em diferentes relações S_0/X_0 e os métodos para identificação dos microrganismos coletados nas amostras inicial (AI) e pico da fermentação (AF).

4.1 INÓCULO

Foi utilizado o lodo granular de reator anaeróbio como inóculo, proveniente de uma estação de tratamento de efluentes de indústria de óleo vegetal, localizada na cidade de Esteio, Rio Grande do Sul.

4.2 MEIOS DE CULTIVO

Foi utilizada vinhaça de cana de açúcar como única fonte de carbono. A vinhaça foi proveniente da indústria de etanol Guarani (Unidade Industrial Andrade – Pitangueiras/SP), coletado em setembro de 2015 e mantido em câmara fria a 4°C. A vinhaça foi previamente caracterizada com relação à composição elementar. A metodologia utilizada foi de acordo com APHA (2002), conforme Tabela 2. Antes da preparação dos meios de cultivo, a vinhaça foi centrifugada a 4.000 rpm por cinco minutos para a retirada dos sólidos grosseiros.

4.3 CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE FERMENTAÇÃO

Os testes de fermentação em batelada foram realizados no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) da Universidade de Caxias do Sul e Laboratório de Diagnostico Molecular (LDM – IB UCS).

Foi utilizado um fermentador com capacidade para 7,5L (New Brunswick BioFlo/CelliGen fermentor). Os testes foram conduzidos com pH 7, temperatura a 37°C e agitação com frequência de 60rpm.

Tabela 2 - Parâmetros químicos relacionados a vinhaça.

PARÂMETROS	QUANTIDADE	METODOLOGIAS
Cálcio total (mg.L ⁻¹)	364.800	Espectrometria de Absorção atômica – APHA 3030E e 3111B
Demanda Química de Oxigênio (mg.L ⁻¹)	20,84	Método de titulação - refluxo fechado – APHA 5220 B
Fósforo total (mg.L ⁻¹)	58,787	Espectrometria de Absorção atômica – APHA 3030E e 3111B
Magnésio total (mg.L ⁻¹)	169,920	Espectrometria de Absorção atômica - APHA 3030E e 3111B
Nitrogênio Amoniacal (mg.L ⁻¹)	38,97 ± 0,16	Método de titulação – APHA 4500 NH ₃ C
Nitrogênio total kjeldahl* (mg.L ⁻¹)	394,69	Método 4500-Norg-B [LAPAM PE 013] 2,80
pH	4,22	Potenciometria
Potássio (mg.L ⁻¹)	2537,650	Fotometria em chama – APHA 3500K-B
Sódio (mg .L ⁻¹)	50,47	Fotometria em chama – APHA 3500Na-B
Sulfetos (mg .L ⁻¹)	n.d.	SMEWW-Método 4500-S2-D [LAPAM PE 024]
Sólidos Suspensos Totais (mg .L ⁻¹)	3480	Gravimetria - APHA 2540 D
Sólidos Suspensos Voláteis (mg.L ⁻¹)	2860	Gravimetria - APHA 2540 G
Ferro Total (mg.L ⁻¹)	11,73	Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres- Fermentados Alccólicos Método 33
Manganês total (mg.L ⁻¹)	1,67	Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres- Fermentados Alccólicos Método 33
Sólidos Suspensos Fixos (mg.L ⁻¹)	250	Gravimetria - APHA 2540 E

Os cultivos de bancada com meios nutritivos foram realizados em frascos Duran de 610 mL, realizados com enriquecimento do inóculo, ambientado durante 24h em meio *Zinder* e 3,2g de acetato de sódio. O experimento foi conduzido em *shaker* com agitação de 140rpm, a 37°C. O inóculo sem enriquecimento foi ambientado somente com água. Após 24h a massa celular foi filtrada, pesada (5,5g) e colocada em frascos de 610 mL, contendo 366 mL de meio contendo vinhaça em diferentes concentrações e 40% de *headspace*. As fermentações foram realizadas em triplicata em 4 concentrações de substrato, respeitando a relação $S_0/X_0= 0,5; 1,0; 1,5$ e $1,7$. O pH foi ajustado periodicamente para 7,2 com solução de KOH 3 mol.L⁻¹. As análises de DQO, carboidratos totais e ácidos graxos voláteis foram feitas para amostras inicial (0h), meio (168h) e final (336h) da fermentação. A quantidade de metano produzido foi medida durante 14 dias através de cromatógrafo a gás.

4.4 METODOLOGIAS ANALÍTICAS RELATIVAS AOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

4.4.1 Determinação de ácidos graxos voláteis

Para as amostras coletadas da fração líquida, foram realizadas análises de ácidos graxos voláteis (ácido acético, propiônico, butírico, iso-butírico, valérico e isovalérico) em cromatografia em fase gasosa (GC/MS, Shimadzu- QP 2010 Ultra), equipado com coluna DN- FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) com detector de ionização de chama (FID - *Flame Ionization Detector*), tendo Hélio como gás de arraste e ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares. A temperatura da coluna foi de 100°C por 5 min, aumentando 7°C por min até 200°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 200 e 250°C, respectivamente.

4.4.2 Determinação de biomassa e carboidratos totais

As análises iniciais e finais de concentração de biomassa foram monitoradas através da análise de Sólidos Suspensos Totais e Demanda Química de Oxigênio, de acordo com Standard Methods (APHA, 2012).

A concentração de carboidratos totais das amostras foram determinada por método colorimétrico utilizando sacarose como padrão (DUBOIS et al, 1956).

4.4.3 Análise da composição e volume de biogás na fermentação

A fim de monitorar o processo de produção de metano, foram realizadas análises da composição e do volume do biogás gerado. As análises foram realizadas em cromatógrafo em fase gasosa (DaniMaster AS), com coluna CarboxenTM 1006 PLOT *Capillary Column* (30mx0,53mm), com detector de condutividade térmica (TCD- *Thermal Conductivity Detector*), tendo gás Nitrogênio ultra puro como gás de arraste. Foi efetuada curva de calibração para metano.

4.5 MEIOS NUTRITIVOS PARA ENRIQUECIMENTO DO INÓCULO

Para enriquecimento do inóculo, foram adicionados meios específicos, com sais e elementos de metais traço, conforme Tabela 2.

Tabela 3 - Composição do meio basal Zinder

Componente	Quantidade ou concentração
NH ₄ Cl	0,5 g. L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,4g. L ⁻¹
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,1 g. L ⁻¹
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,05 g. L ⁻¹
Solução de resazurina 0,1% m/v	1,0mL
Solução traço de metais	10,0mL
Solução de vitaminas	1%
Água Milli-Q	q.s.p. 1000mL

4.5.1 Solução traço de metais

O meio basal foi composto pela solução traço de metais, descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição da solução traço de metais Zinder.

Reagentes	Quantidade
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,556g
MnSO ₄ H ₂ O	0,086g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,01g
NiCl ₂ 6H ₂ O	0,02g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,17g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,21g
H ₃ BO ₃	0,19g
Água Milli-Q	q.s.p.1000mL

4.5.2 Solução de resazurina e de vitaminas

A solução de resazurina 0,1% (m/v), presente no meio basal, é uma solução indicadora do potencial de óxido-redução do meio de cultivo, ou seja, indicadora de anaerobiose. Foi preparada e armazenada sob refrigeração, a 4°C, em frasco âmbar.

A solução de vitaminas foi preparada em água destilada, adicionando-se os componentes descritos na Tabela 4. A solução foi esterilizada por filtração através do sistema Millipore com membrana de 0,22 µm. Em seguida, foi colocada em frascos âmbar de 500mL, e armazenadas sob refrigeração.

Tabela 4: Composição da solução de vitaminas para o crescimento de arqueas metanogênicas.

REAGENTE	Quantidade (g/L água destilada)
Biotina	0,002
Ácido Fólico	0,002
Tiamina HCl	0,005
Riboflavina	0,005
Ácido Nicotínico	0,005
Pantotenato de Cálcio	0,005
Piridoxina HCl	0,010
Vitamina B12	0,0001
Ácido Lipoico	0,005

Fonte: Vazzoler, 1995.

4.6 MÉTODOS MOLECULARES

A fim de identificar microrganismos não cultiváveis ou de difícil cultivo, foram utilizadas técnicas de biologia molecular, tais como: extração de DNA, PCR e sequenciamento de alto desempenho.

4.6.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de 250µl de amostra com o kit de extração *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories, E. U. A.), de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 2,0µl do DNA extraído das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0% (75 volts, 35 minutos). O Quick Load DNA Marker 100-5000 pares de base (pb), da *Bio Labs*, foi utilizado como marcador de peso molecular. Após a eletroforese o gel foi observado em transluminador de luz UV e as imagens obtidas por um sistema de captura de imagens.

4.6.2 Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

As ampliações do material genético foram realizadas com o kit *Phusion High-Fidelity™ PCR* (Finnzymes), seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados primers oligonucleotídeos universais 515F e 806R (Bates et al, 2011) . Após o término da reação, foi realizada eletroforese com gel de agarose para visualização do amplificado.

4.6.3 Sequenciamento de alto desempenho (*metabarconding*)

Para análise de metabarcoding das comunidades presentes nas amostras de reator anaeróbio, os fragmentos dos genes 16S gerados por PCR com os oligonucleotídeos universais 515F e 806R (Bates et al, 2011) foram submetidos ao sequenciamento de alto desempenho utilizando-se a plataforma *Ion PGM System* (Thermo Fisher).

A construção das bibliotecas foi realizada com o kit *Ion Plus Fragment Library* para amplicons curtos (≤ 350 pb), a partir de 100 ng de produto de amplificação. A cada amostra foi adicionado um adaptador (*barcode*) do kit *Ion Xpress Barcode 1-16*, para que as amostras pudessem ser sequenciadas em uma mesma corrida. Todos os procedimentos para a construção das bibliotecas foram realizados de acordo com o fabricante.

Para quantificação e equalização das bibliotecas, foi utilizado o kit *Ion Library Equalizer*, conforme recomendado pelo fabricante. Para PCR em emulsão e passos de enriquecimento foi utilizado o kit *Ion PGM Template OT2 200*, com o equipamento *Ion OneTouch 2 System*. Para sequenciamento foi utilizado um chip *Ion 316*, com o kit *Ion PGM Sequencing 200 v2*, segundo o fabricante.

4.6.4 Análise do sequenciamento de alto desempenho

Os fragmentos do gene 16S rRNA foram submetidos a um controle de qualidade que mantém as sequências com comprimento mínimo de 100 pb e remove bases de baixa qualidade ($\text{phred} < 30$) usando o programa PRINSEQ (SCHMIEDER, EDWARDS, 2011). As sequências replicadas foram identificadas, classificadas e filtradas para excluir sequências únicas usando o programa USEARCH v7.0.1090 (EDGAR, 2010). Os *clusters* foram montados usando uma identidade mínima de 99% e quimeras foram removidas usando o banco de dados de referência RDP (COLE et al., 2013). A atribuição taxonômica foi obtida utilizando QIIME v1.7 (CAPORASO et al., 2010) com base de 97% de semelhança das sequências com o banco de dados GreenGenes 13.8 (DE SANTIS et al., 2006).

5 RESULTADOS

Os resultados foram apresentados na forma de capítulos através de artigos:

5.1 Capítulo 1 Estudo comparativo do uso de meios nutritivos para otimização na produção de biogás – Submetido a FIEMA.

5.2 Capítulo 2 Análise da produção de biogás em batelada sob condição mesofílica, a partir da vinhaça de cana de açúcar, sem e com ambientação prévia do inóculo e identificação da microbiota presente em biorreator com melhor produção de metano. Submetido a Revista Brasileira de Energias Renováveis.

5.3 Capítulo 3 Sequenciamento de alto desempenho como ferramenta para a identificação de bactérias e arqueas responsáveis pela produção de biogás a partir de vinhaça – a definir.

5.1 Capítulo 1. Estudo comparativo do uso de meios nutritivos para otimização na produção de biogás

Janaina Iltchenco¹; Lademir Luiz Beal²; Ana Paula Rodrigues Torres³; Maíra Paula de Sousa⁴, Suelen Paesi⁵

1Universidade de Caxias do Sul (jiltchen@ucs.br)

2Universidade de Caxias do Sul (lbeal@ucs.br)

3CENPES/PETROBRAS (aportres@petrobras.com.br)

4CENPES/PETROBRAS (mpsousa@petrobras.com.br)

5Universidade de Caxias do Sul (sopaesi@ucs.br)

Resumo

A emissão de gases poluentes em ocasião da queima de combustíveis fósseis vem sendo discutida, principalmente no âmbito de desenvolver formas sustentáveis para obtenção de energia. Uma das alternativas é o biogás, produzido através da fermentação anaeróbia a partir de resíduos agroindustriais, podendo ser utilizado como biocombustível. Os principais componentes do biogás são o metano e o dióxido de carbono. Para otimização do processo de fermentação, é necessária a utilização de nutrientes para o crescimento da biomassa. Este trabalho teve como objetivo comparar a eficácia de dois meios nutritivos com acetato, observando a produção de metano para enriquecimento do inóculo. Os ensaios foram realizados em frascos Duran de 600mL, em duplicatas, com total de 244 mL dos meios nutritivos; 3,6g de acetato e 20g/L de lodo. Os cultivos foram mantidos a 37°C, sob agitação orbital, por 15 dias. Coletas de amostra de gás foram feitas para análise em cromatógrafo a gás no 3º, 7º, 10º e 15º dias. Houve menor produção de metano em meio Zinder com 0,2625mmol/CH₄ e o meio Monteggia teve produção de 0,3502 mmol de CH₄ no 10º dia. A adição de acetato aos meios nutritivos proporcionou maior produção de metano: 5,911 mmol/CH₄ (meio Zinder) no 7º dia e 5,510 mmol/CH₄ (meio Monteggia) no 10º dia. Os resultados indicam que o meio nutritivo Zinder com acetato de sódio foi efetivo para o crescimento microbiano em sete dias na produção de biogás.

Palavras-chave: Biogás, Fermentação, Biomassa, Meios Nutritivos.

Agência de fomento: Petrobrás

Área Temática: Biocombustíveis

Comparative study of the use of nutritional means to optimize the production of biogas

Abstract

The emission of pollutant gases by the time of the burning of fossil fuels has been discussed primarily in the context of developing sustainable ways of obtaining energy. One alternative is biogas produced by anaerobic fermentation of organic residues and can be used as biofuel. The main components of biogas is methane and carbon dioxide. For optimization of the fermentation process, the use of nutrients for growth of the biomass is necessary. This study aimed to compare the efficacy of two nutrient media with acetate, watching the methane production for enrichment of inoculum. Assays were performed in 600mL Duran bottles, in

duplicate, with a total of 244 ml of nutrient media; Acetate 3.6g and 20g / L sludge. The cultures were maintained at 37 ° C under orbital shaking for 15 days. Gas sample collections were made to analyze in gas chromatograph in the 3th, 7th, 10th and 15th days. There was a lower methane production as in Zinder with 0,2625mmol / CH₄ and Monteggia half was produced by CH₄ 0.3502 mmol of the 10th day. The addition of acetate to nutrient media showed higher methane production: 5.911 mmol / CH₄ (medium Zinder) on the 7th day and 5,510 mmol / CH₄ (medium Monteggia) on the 10th day. The results showed that the nutrient media Zinder with sodium acetate was effective in microbial growth in seven days in the production of biogas

Key words: Biogas, Fermentation, Biomass, Nutrition Means

Theme Area: Biofuels

1.INTRODUÇÃO

Países de todo o mundo buscam tecnologias para diminuir as emissões de gases de efeito estufa e ampliar a oferta de energias renováveis para atender a demandas de energia. Muitas são as estratégias para redução da incidência de gases poluentes que podem causar danos ao meio ambiente. Entre elas, encontra-se a produção de biogás, que utiliza resíduos agroindustriais como substrato para fermentação anaeróbia, sendo também uma forma de reaproveitamento desses resíduos. O estudo de processos naturais de degradação de resíduos pode ser uma inspiração biotecnológica sustentável. As interações com microrganismos envolvidos nos processos fermentativos variam conforme as substâncias químicas do meio e com os compostos orgânicos disponíveis.

O lodo anaeróbio é constituído por uma população bacteriana, que desenvolve o processo de digestão por fases, (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese), desde o material orgânico mais complexo (carboidratos, proteínas e lipídios) até o material de menor peso molecular na formação do metano e gás carbônico(SOUZA, 2011). A presença de uma comunidade microbiana diversificada é relacionada diretamente a uma maior disponibilidade de caminhos potenciais de conversões metabólicas (BRIONES e RASKIN 2003; CARBALLA et al. 2011; PETERSON et al. 1998). As interações das metanogências com outros anaeróbios podem ser sintróficas obrigatórias, havendo uma dependência da produção do metano ligada ao crescimento de outros microrganismos (VAN HAANDEL, 2006). Por essa razão a produção anaeróbica de biogás é avaliada a partir de consórcios microbianos.

Os principais componentes do biogás são o metano e o dióxido de carbono, podendo conter alguns contaminantes como sulfeto de hidrogênio e amônia. A vantagem no uso do biogás como combustível não é a inexistência do dióxido de carbono (CO₂) como produto final da reação, mas sim a eliminação da emissão de metano na atmosfera.

O biogás pode substituir até 40% do fornecimento anual de diesel nas operações agrícolas de uma biorrefinaria de cana e ainda fornece 14MWh anualmente a partir de cogeração, podendo beneficia-la financeiramente devido a comercialização de créditos de carbono, cobrindo o custo operacional de uma planta de digestão anaeróbia (MORAES et al., 2014).

O metano corresponde a 87,35% da composição do gás natural e é um gás mais potente que o CO₂ quanto aos efeitos de aquecimento global (BESSA, 2010). O metano, assim como o dióxido de carbono e o óxido nitroso, é um importante gás traço da atmosfera.

O tempo médio de residência do CH₄ na atmosfera é estimado em dez anos, e a estabilização do seu teor requer diminuição de 5% na sua emissão, atingindo 515 milhões de toneladas por ano. A absorção de radiação infravermelha pelo metano ocorre em uma banda de comprimento de onda ao redor de 7µm. (TORRENTINO, ROCHA-FILHO, 2015).

O metano forma um radical metila (CH₃), que reage com o oxigênio, formando formaldeído (HCHO ou H₂CO). O formaldeído reage para formar o radical (HCO), que então forma o monóxido de carbono (CO). O processo é chamado pirólise. Seguindo a pirólise oxidativa, o H₂ oxida, formando H₂O, reabastecendo a espécie ativa, e liberando calor. Finalmente, o CO oxida-se, formando CO₂ e liberando mais calor (SOARES,2010).

Para otimização do processo de fermentação, é necessário o enriquecimento do inóculo adicionando-se meios nutritivos, havendo uma maior produção de biogás. Este trabalho teve como objetivo comparar o uso de dois meios nutritivos com acetato na produção de metano.

2.METODOLOGIA

Para este experimento, utilizou-se lodo de estação de tratamento de óleo vegetal como biomassa, e meios nutritivos descritos por Zinder e Koch (1984) e meio descrito por Monteggia (1997) e acetato de sódio. Os ensaios foram realizados em frascos Duran de 600mL, em duplicatas, com 244mL de meio nutritivo, 3,3g de acetato e 20g/l de lodo proveniente de estação de tratamento de óleo vegetal. Foi feito um controle somente com lodo e meio nutritivo, sem adição de acetato. O pH foi corrigido para 7, com KOH. Gás N₂ foi fluxionado por 10 min a fim de manter a anaerobiose do meio. Os frascos foram mantidos em shaker a 37°C sob agitação orbital, por 15 dias. Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Diagnóstico Molecular.

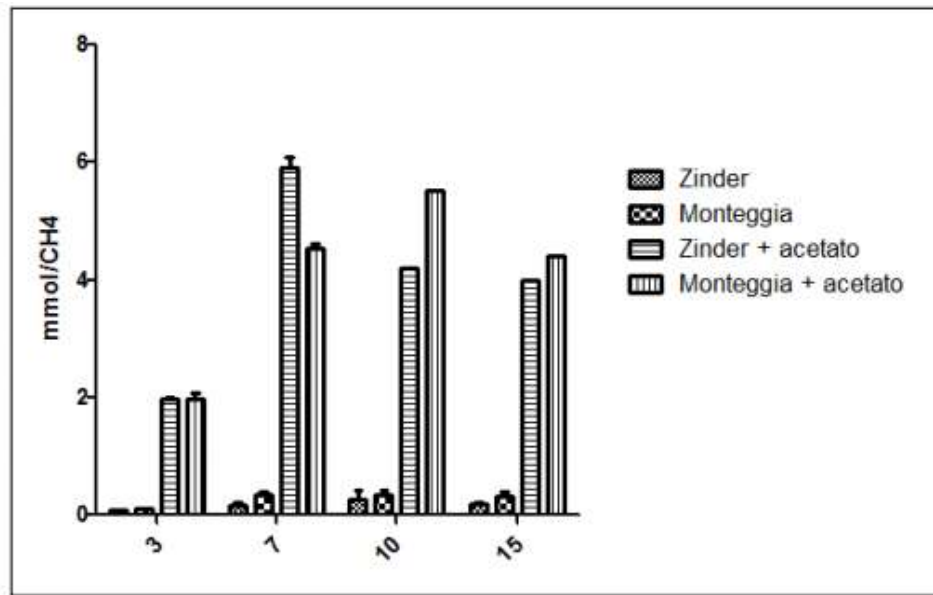
As medições de gás foram realizadas no 3º, 7º, 10º e 15º dia, no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) através de cromatógrafo a gás *DaniMaster – Automatic Sample AS*), com coluna CarboxenTM 1006 PLOT Capillary Column (30mx0,53mm), com detector de condutividade térmica (TCD- Thermal Conductivity Detector) tendo gás Nitrogênio ultra puro como gás de arraste. Foi efetuada curva de calibração para metano.

A fim de verificar o crescimento dos microrganismos, o meio foi centrifugado a 6000 rpm por 15 min, em três repetições com água destilada a fim de “lavar” as células. O pellet foi colocado em cadinhos de porcelana de 125mL e 50mL, e colocados em estufa a 100°C por 24h. Após este período, o material foi pesado. As análises e gráfico foram feitas através do programa Prisma 5.0.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio Zinder para o desenvolvimento de culturas anaeróbias estritas, particularmente de arqueas metanogênicas, tem na sua constituição fontes de macronutrientes nitrogênio e fósforo (PAZINATO,2007). Os organismos metanogênicos requerem vitaminas, minerais e fontes de enxofre específicas, sendo pobremente exigentes em relação à fonte de carbono (GARCIA; PATEL; OLLIVIER, 2000; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). As medições realizadas no cromatógrafo a gás (Figural) mostraram que o pico ótimo para a produção de metano foi no 7º dia, produzindo 7,591 mmol/CH₄ (meio Zinder com acetato) e no 10º dia o valor de 5,510 mmol/CH₄ (meio Monteggia). Os meios com adição de acetato foram efetivos, por conter um componente existente na via metabólica acetotrófica, propiciando crescimento das arqueas.

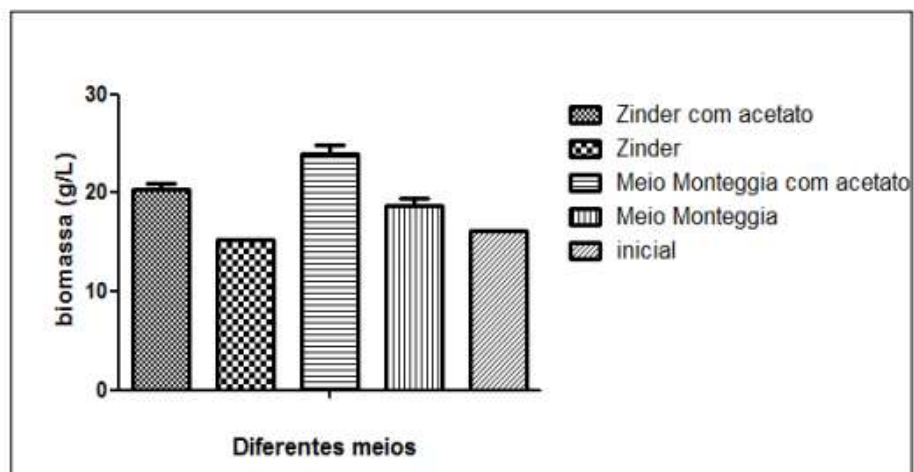
Figura1. Produção de metano em diferentes meios.



Fonte: O autor

Para verificar o crescimento da biomassa foi medido o peso seco (Figura2), e observou-se aumento da biomassa no meio descrito por Monteggia com adição de acetato (24g/L), com relação a biomassa inicial (16,18g/L).

Figura2: Biomassa final e inicial em diferentes meios nutritivos.



Fonte: O autor

O uso de fonte acetotrófica em conjunto com enriquecimento do inóculo foi fundamental para promover o desenvolvimento das arqueas metanogênicas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este resultado mostrou que o uso de meios enriquecidos aumenta a produção de metano por estimular o crescimento da biomassa e atender suas exigências nutricionais na produção de biogás.

5.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BESSA, VMT. **Contribuição à metodologia de avaliação das emissões de dióxido de carbono no ciclo de vida de fachadas de edifícios de escritórios**. 2010. 286 f. 2010. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Escola Politécnica, USP, São Paulo.

BRIONES A, RASKIN L. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. **Current Opinion Biotechnology** 14(3):270–276. 2003.

CARBALLA, M.; SMITS, M.; ETCHEBEHERE, C.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 89(2):303–314.2011.

GARCIA, J.L.; PATEL, B.K.C.; OLLIVIER, B. Taxonomic phylogentic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, Amsterdam, v. 6, p. 205-226, 2000.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10 ed. São Paulo: Editora Pearson Education do Brasil, 208 p, 2004.

MONTEGGIA, L. Proposta de metodologia para avaliação do parâmetro Atividade Metanogênica Específica. In: 19^o Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES, Foz do Iguaçu, 1997.

MORAES, B. S., JUNQUEIRA, T. L., PAVANELLO, L. G., CAVALETT, O., MANTELATTO, P. E., BONOMI, A., ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense?. **Applied Energy**, v. 113, p. 825-835, 2014.

PAZINATO, J. M. Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental. 188p. 2007. **Tese de Doutorado**. Tese (Doutorado)–Ecologia de Agroecossistemas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/CENA. Piracicaba (SP).

PETERSON G, ALLEN C.R, HOLLING C.S. Ecological resilience, biodiversity, and scale. **Ecosystems** 1(1):6–18. 1998. Disponível em:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs100219900002> Acesso em : 15.nov.2015.

SOARES, Henrique Arruda. Captar Biogás (CH₄) dos Aterros de Resíduos e Transformar em Energia Elétrica. Proposta Mitigadora para Passivos Ambientais Municipais Gerados na Disposição de Resíduos Sólidos em Aterros. Artigo de Conclusão de Curso de Resíduos Sólidos, CENED. 2014. Disponível em: <http://www.cenedcursos.com.br/wp-content/uploads/2014/06/de-Lix%C3%A3o-para-Eletricidade.pdf> Acesso em: 15.nov.2015.

SOUZA, F.A.F. **Adaptação de lodo sanitário e industrial ao tratamento do vinhoto.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental)–COENGE–Universidade Federal de Campina Grande–UFCG. Campina Grande–PB: UFCG, 2011.

TOLENTINO, M. ; ROCHA-FILHO, R. C. A química no efeito estufa. **Química Nova na Escola**, n. 8, 2015. Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/novo/index.php?hash=tema.21>. Acesso em: 01.dez.2015.

VAN HAANDEL, A. C.; ALEM SOBRINHO, P. Produção, composição e constituição de esgoto. In: *Biossólidos – Alternativas de Uso de Resíduos de Saneamento*. Rio de Janeiro: ABES, 417p. 2006

ZINDER, S.H.; KOCH, M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 138, p. 263-272, 1984.

5.2 CAPITULO2: Submetido a Revista Brasileira de Energias Renováveis

Revista Brasileira de Energias Renováveis

[CAPA](#) [SOBRE](#) [PÁGINA DO USUÁRIO](#) [PESQUISA](#) [ATUAL](#) [ANTERIORES](#)

Capa > Usuário > Autor > Submissões > #53123 > **Resumo**

#53123 Sinopse

RESUMO [AVALIAÇÃO](#) [EDIÇÃO](#)

Submissão

Autores	Suelen Paesi, Janaina Iltchenko
Título	Análise da produção de biogás em batelada sob condição mesofílica, a partir da vinhaça de cana de açúcar, sem e com pré-enriquecimento do inóculo e identificação da microbiota presente em biorreator com melhor produção de metano
Documento original	53123-205191-1-SM.DOCX 08-06-2017
Docs. sup.	Nenhum(a) INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR
Submetido por	Suelen Paesi
Data de submissão	junho 8, 2017 - 05:12
Seção	Artigos
Editor	Nenhum(a) designado(a)
Comentários do Autor	Caxias do Sul, 09 de junho de 2017. Caro editor

Estou encaminhando a sua apreciação o artigo "**Análise da produção de biogás em batelada sob condição mesofílica, a partir da vinhaça de cana de açúcar, sem e com pré-enriquecimento do inóculo e identificação da microbiota presente em biorreator com melhor produção de metano**". Trata-se de um artigo inédito que busca novos conhecimentos para a produção de Biogás. leitores em relação à impacto ambiental, biodegradação e resíduos. Acredito que nosso texto fará contribuições científicas e acadêmicas, especialmente entre alunos de pós-graduação que tenham interesse na área de engenharia Química e Ambiental, Biotecnologia e Microbiologia. Informo que os autores fizeram contribuições significativas ao artigo, aprovaram o texto submetido e autorizam a sua publicação do artigo.

5.2. Capítulo 2. Análise da produção de biogás em batelada sob condição mesofílica, a partir da vinhaça de cana de açúcar, sem e com ambientação prévia do inóculo e identificação da microbiota presente em biorreator com melhor produção de metano.

Iltchenko, Janaina^{a*}; Almeida, Leandro G. ^a; Beal, Lademir L. ^b; Giongo, Adriana^c; Borges, L.G.A.^c; Torres, Ana P.R.^d; Paesi, Suelen^a

^aUniversidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Diagnóstico Molecular.

^bUniversidade de Caxias do Sul, Laboratório de Tecnologias Ambientais.

^cPontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais.

^dResearch and Development Center Leolpodo Américo Miguez de Mello, PETROBRAS, BR.

* **Correspondência do Autor:** Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Diagnóstico Molecular. Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 -CEP 95070-560 - Caxias do Sul-RS- Brazil. Fone: +55 54 3218-2665. E-mail: jiltchen@ucs.br

Destaques

- As relações S_0/X_0 a partir de lodo de ETE previamente ambientado e vinhaça, foram testadas em batelada e condições mesofílicas para a produção de metano
- A produção de ácidos, consumo de carboidratos e DQO foram avaliados.
- A comunidade microbiana de amostras em 0h e 336h de reator em batelada com maior produção de metano foi avaliada, demonstrando uma rica diversidade de microrganismos.

Resumo

A vinhaça é um resíduo da produção de etanol, e pode ser aproveitada para a produção de biogás através da digestão anaeróbia. Nesse sentido, esse trabalho tem como objetivo avaliar a produção de metano e coprodutos a partir de vinhaça, com ambientação prévia do inóculo sem meio nutritivo (SE) e com meio Zinder, vitaminas e acetato de sódio (CE), e identificar a microbiota do bioensaio com a melhor produção de metano por meio de sequenciamento de alto desempenho. Foram realizados bioensaios a partir de lodo de estação de tratamento de efluente (SE e CE), em meios contendo vinhaça em diferentes relações S_0/X_0 . Avaliaram-se os parâmetros: atividade metanogênica, DQO, carboidratos e ácidos graxos voláteis. Os testes SE e CE mostraram-se efetivos para o consumo de carboidratos e remoção da DQO. Destacou-se o bioensaio SE na relação $S_0/X_0=1,5$ que produziu 12,48 mmol CH_4/g DQO. A microbiota avaliada no pico de produção (AF) mostrou a predominância de bactérias do Filo Bacteroidetes, gênero *Bacteroides* e uma OTU pertencente à Família *Porphyromonadaceae*; e arqueas *Methanobacterium*, *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. Esse estudo mostra a potencialidade da vinhaça na produção de metano em batelada e condições mesofílicas, e a rica diversidade da microbiota sendo um fator essencial para o entendimento e controle de processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Metano, vinhaça, sequenciamento de alto desempenho, 16S rRNA, bactérias, arqueas.

1.Introduction

O Brasil é o maior produtor de etanol de cana de açúcar mundial, produzindo cerca de 660 milhões de toneladas por ano (Brasil, 2016). O etanol representa uma das principais alternativas para reduzir a dependência de combustíveis fósseis. O processo biológico da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar gera coprodutos, entre eles a vinhaça. A vinhaça é um resíduo líquido de elevada carga orgânica, coloração marrom escura, de baixo pH, alto teor de sais e altamente poluente (Satyawal; Balakrishanan, 2008). A elevada produção de vinhaça pela indústria sucroalcooleira requer a busca de gerenciamento ambiental deste resíduo. O biogás é uma alternativa sustentável para produção de energia, sendo produzido a partir de resíduos agroindustriais, onde pode ser utilizada a vinhaça como substrato. A produção de biogás através da biodigestão da vinhaça auxilia na redução do potencial poluidor deste resíduo gerando coprodutos de valor agregado e ainda um biofertilizante de alta qualidade para agricultura. O consórcio de microrganismos atuantes no processo realiza uma serie de reações metabólicas complexas envolvendo diversas espécies de bactérias e arqueas que atuam de forma simbiótica, evidenciando etapas intermediárias, como hidrólise, acidogênese, acetogênese, e metanogênese. Contudo, novos conhecimentos são requeridos para se conhecer os parâmetros e os microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia. O objetivo desse estudo foi avaliar a produção de metano e coprodutos a partir de vinhaça, em bioensaios com prévia ambientação do inóculo e identificar a microbiota do bioensaio com a melhor produção de metano por meio de sequenciamento de alto desempenho.

2 Materials and Methods

2.1 Ambientação prévia do inóculo

O estudo foi realizado utilizando, como inóculo, o lodo granular oriundo de reator anaeróbio (UASB), tratando efluente da indústria de óleo vegetal. O inóculo foi pesado (5,5 g), levemente macerado e suspenso em 500 mL de água estéril, fluxionado com nitrogênio gasoso durante 15 min, e colocado em agitação orbital a 140 rpm a 37°C por 24 h. Foi ambientado por 24h, para seleção de microrganismos, com meio basal *Zinder* (Zinder; Koch, 1984), composto por: 0,5 g de NH₄Cl, 0,4 g de KH₂PO₄, 0,1 g de MgCl₂ 6H₂O, 0,05 g de CaCl₂ 2H₂O, solução de resazurina a 0,1 % m/v – 1 mL; Solução traço de metais (FeSO₄ 7H₂O 0,556 g; MnSO₄ H₂O 0,086 g; Na₂MoO₄ 2H₂O 0,01 g; NiCl₂ 6H₂O 0,02 g; CoCl₂ 6H₂O 0,17 g; ZnSO₄ 7H₂O 0,21 g ; H₃BO₃ 0,19 g; água ultrapura qsp 1000 mL) 10mL, adicionado de Solução de vitaminas (Vazzoler,1995) (Biotina 0,002g, Ácido Fólico 0002 g, Tiamina HCl 0,005 g, Riboflavina 0,005 g, Ácido Nicotínico 0,005 g, Pantotenato de Cálcio 0,005 g, Piridoxina HCl 0,010 g, Vitamina B12 0,0001 g , Ácido Lipóico 0,005 g e água ultrapura q.s.p 1000 mL) a 1%. Foi adicionado 2g/L de acetato de sódio no meio nutritivo. A ambientação do inóculo ocorreu somente com água para testes sem enriquecimento, durante 24h.

2.2 Condições operacionais

Foi utilizada vinhaça de cana-de-açúcar proveniente da indústria Guarani SP (Pitangueiras/SP), como única fonte de carbono. A composição físico-química da vinhaça está apresentada na Tabela 1. Antes da preparação dos meios de cultivo, a vinhaça foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min para retirada dos sólidos grosseiros. Os experimentos foram feitos em triplicata, a partir de quatro diferentes relações substrato/biomassa ($S_0/X_0 = 0,5; 1,0; 1,5$ e $1,7$) (Tabela 2). Os biorreatores com volume total de 610mL e 240mL de *headspace* foram operados ao longo de 14 dias, sob condição mesofílica (37°C). O pH foi ajustado periodicamente, entre 6,8 e 7,2 (KOH 3M). Os biorreatores foram colocados sob agitação orbital em shaker a 140 rpm, por um período de 14 dias. Ao longo da fermentação, foram coletadas amostras inicial (0h), meio (168h) e final (336h) de amostras líquidas que seguiram para análises químicas e biológicas. As amostras gasosas foram coletadas do *headspace* a cada 24 horas de fermentação.

2.3 Análises químicas da produção de metano

As análises da produção de metano foram realizadas em cromatografia gasosa (DaniMaster AS), com coluna Carboxentm 1006 PLOT *Capillary Column* (30 m x 0,53 mm), com detector de condutividade térmica (TCD-*Thermal Conductivity Detector*), tendo gás Nitrogênio ultra puro como gás de arraste. A quantidade de metano produzido foi medida através de cromatógrafo a gás a cada 24h, durante 14 dias. Foi efetuada uma curva de calibração com a utilização de gás metano padrão. Os ácidos graxos voláteis, acético, propiônico, butírico, iso-butírico, valérico e isovalérico foram analisados por cromatografia gasosa (GC/MS, Shimadzu-QP 2010 Ultra), equipado com coluna DN- FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm) com detector de ionização de chama (FID - *Flame Ionization Detector*), tendo hélio como gás de arraste e ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares. A temperatura da coluna foi 100°C por 5 min, aumentando 7°C por min até 200°C . As temperaturas do injetor e do detector foram de 200 e 250°C , respectivamente. As análises de DQO foram determinadas seguindo o Standard Métodos (APHA 2012). A concentração de carboidratos totais das amostras foi determinada por método colorimétrico utilizando sacarose como padrão (DUBOIS et al., 1956).

2.4 Análise estatística

Os dados experimentais em triplicata foram ajustados usando o software Statistica (versão 10). O modelo de Gompertz modificado (LAY et al., 1997) foi utilizado para estimar os parâmetros cinéticos (R_m , H_{max} e λ) para a produção de metano nos ensaios contendo diferentes relações Substrato/Biomassa (Equação 1).

$$M = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde: M é a produção cumulativa de metano; λ é o tempo da fase lag (h); P é a produção de metano em mL ; R_m é a produção máxima de metano ($\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$); e é a constante (2.72).

2.5 Sequenciamento de alto desempenho

O DNA genômico dos consórcios microbianos foi extraído a partir de 250 μL de amostra com o kit *PowerSoil DNA Isolation Kit* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi amplificado por PCR com os primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') para o gene 16 S. As condições de amplificação seguiram 35 ciclos (95°C, 30 s; 50°C, 1 min; 72°C, 1 min) após uma desnaturação inicial 95°C, 3 min (BATES et al., 2011); em termociclador Applied Biosystems 2720, Thermal Cycler. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1%.

Amostras de DNA extraídas da Amostra Inicial (AI) e AMOSTRA DO PICO DE PRODUÇÃO (AP) da fermentação de maior produção de metano foram enviadas para o Instituto do Petróleo e Recursos Renováveis (PUCRS), a fim de realizar o sequenciamento de alto desempenho (plataforma *Ion PGM System* - Thermo Fisher).

A construção das bibliotecas foi realizada com o kit *Ion Plus Fragment Library* para amplicons curtos ($\leq 350\text{pb}$), a partir de 100 ng de produto de amplificação. Foi adicionado um adaptador (*barcode*) do kit *IonXpress Barcode 1-16*, a cada amostra. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o fabricante.

Para quantificação e equalização das bibliotecas, foi utilizado o kit *Ion Library Equalizer*, conforme fabricante. Para PCR em emulsão e passos de enriquecimento foi utilizado o kit *Ion PGM Template OT2 200*, com o equipamento *IonOneTouch 2 System*. Para sequenciamento foi utilizado um chip *Ion 316*, com o kit *Ion PGM Sequencing 200 v2*, segundo o fabricante.

Os fragmentos do gene 16S rRNA gerados pelo sequenciamento foram submetidos a um controle de qualidade usando o programa PRINSEQ (SCHMIEDER e EDWARDS, 2011). As sequências replicadas foram identificadas, classificadas e filtradas para excluir sequências únicas usando o programa USEARCH v7.0.1090 (EDGAR, 2010). Os *clusters* foram montados usando uma identidade mínima de 99% e quimeras foram removidas usando o banco de dados de referência RDP (COLE et al., 2013). A atribuição taxonômica foi obtida utilizando QIIME v1.7 (CAPORASO et al., 2010) com base de 97% de semelhança das sequências com o banco de dados GreenGenes 13.8 (DE SANTIS et al., 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros analíticos

Para verificar a potencialidade da microbiota na conversão dos nutrientes da vinhaça em biogás e outros compostos, avaliaram-se diferentes parâmetros analíticos como: consumo de carboidratos, a remoção de DQO, produção de ácidos e a quantidade de metano produzido. Os experimentos foram conduzidos com meio nutritivo Zinder, solução de vitaminas e acetato de sódio, utilizado na ambientação prévia e o grupo controle com prévia ambientação do inóculo sem meio nutritivo. Os microrganismos da amostra inicial (AI) e final (AF) no teste com maior produção de metano foram identificados por sequenciamento de alto desempenho.

3.1.1 Produção de metano

No que se refere a produção acumulada de metano, independente da relação S_0/X_0 empregada, valores superiores foram atingidos nos bioensaios SE em comparação aos obtidos CE (Tabela 3). A produção máxima de metano de 613,70 mL foi atingida na relação $S_0/X_0 = 1,5$ no bioensaio SE, com velocidade máxima de produção de $1,91 \text{ mL.h}^{-1}$ e fase lag em 59,34 horas (Tabela 3). Nos testes CE, a maior produção de metano ocorreu na relação $S_0/X_0 = 1$ (324,76 mL), com velocidade de produção de $27,94 \text{ mL.h}^{-1}$ e fase lag em 18,65 h. A produção de metano relacionada ao consumo de DQO foi mais efetiva no bioensaio SE, particularmente na relação $S_0/X_0 = 1,5$, no qual foi observado um pico de produção de 12,25 mmol de $\text{CH}_4/\text{g DQO}$ em 264 horas. Por outro lado, no bioensaio CE foi observado um pico de 5,08 mmol $\text{CH}_4/\text{g DQO}$ em 216 h, na relação $S_0/X_0 = 1$ (Figura 1).

3.1.2 Consumo de carboidratos e DQO

Com relação ao consumo de carboidratos (Tabela 4), nos bioensaios SE, maiores valores percentuais de consumo foram observados nas relações $S_0/X_0 = 1,7$ (89,30%), $S_0/X_0 = 1,5$ (78,58%) seguido de $S_0/X_0 = 1$ (72,71%). Nos bioensaios CE, o maior consumo de carboidratos ocorreu na $S_0/X_0 = 1,0$ (92,14%), seguido de $S_0/X_0 = 0,5$ com 86,42% e 75,72% de consumo de carboidrato na $S_0/X_0 = 1,5$. Entre os bioensaios SE avaliados, a maior eficiência em remoção de DQO foi determinada com $S_0/X_0 = 0,5$ que apresentou 79,66% e a menor remoção foi verificada em $S_0/X_0 = 1,7$ com 16,72% no teste CE. Valor superior em $S_0/X_0 = 0,5$ também foi observado no bioensaio CE (81%). Os experimentos CE e SE, demonstraram valores semelhantes com relação à remoção de DQO, sugerindo que quanto maior a disponibilidade de alimento no meio, maior a dificuldade na remoção da DQO (Tabela 5).

3.1.3 Ácidos graxos voláteis (AGV) presentes na fermentação

Os ácidos formados durante o processo fermentativo em decorrência da metabolização do substrato foram: acético, propiônico, butírico, iso-butírico, valérico e isovalérico. De um modo geral, houve maior produção de ácidos nos bioensaios com a $S_0/X_0 = 1,7$ (Figura 2). No bioensaio SE, durante as 336 horas de processo, pode-se observar a redução da concentração de ácidos, e as demais não foram expressivas quanto a esse critério. Nos ensaios com CE, foi possível observar a maior produção dos ácidos graxos voláteis na relação $S_0/X_0 = 1,7$ e a menor produção, em $S_0/X_0 = 1,0$. O maior consumo de ácidos durante as 336 horas ocorreu CE a relação $S_0/X_0 = 0,5$ (Figura 2). O monitoramento da produção de ácidos graxos voláteis revela etapas de degradação anaeróbia, como também, a atuação de rotas metabólicas dos organismos envolvidos. Em trabalho realizado por Hajarnis e Ranade (1994) é possível inferir que os ácidos podem atuar como inibidores dos microrganismos metanogênicos, por questões termodinâmicas, pela frequente redução do pH do meio e pela toxicidade dos ácidos, desestabilizando reações bioquímicas celulares. Isso foi observado na grande quantidade de ácidos formados na relação $S_0/X_0 = 1,7$ CE, juntamente com pouca quantidade reduzida de metano produzida. Soares (1990) relata que o pH também pode estar relacionado a concentrações de ácidos orgânicos voláteis no meio, e qualquer desequilíbrio no sistema provoca o acúmulo de ácidos e consequente inibição metanogênica.

3.2 Identificação molecular da microbiota através do sequenciamento de alto desempenho

A fim de identificar a microbiota que tem ação destacada nos processos fermentativos, em particular quando observada a maior produção de metano (bioensaio SE, relação $S_0/X_0=1,5$), foram sequenciadas as amostras inicial (0 h) e pico de produção de metano (336 h). O sequenciamento de DNA da amostra inicial (AI) gerou um total de 85.361 sequências, sendo que 78.892 (92,42%) foram aptas para a identificação. Já o sequenciamento de DNA da amostra do pico (AF) gerou um total de 98.472 sequências, com 86.051 de qualidade satisfatória para sequenciamento (87,39%).

Foram identificados 36 filos nas duas amostras, observando-se na AI uma maior diversidade de microrganismos, sendo os filos mais representativos Proteobacteria (20,54%), Bacteroidetes (15,01%) e Euryarchaeota (14,13%). Na amostra do pico de produção os filos mais predominantes foram Bacteroidetes (49,92%), Firmicutes (12,02%) e Proteobacteria (11,23%) (Figura 5).

Em relação às classes microbianas (Figura 6), pode-se identificar a presença de Bacteroidia (12,49%), Deltaproteobacteria (9,23%) e Clostridia (8,13%) como as mais abundantes na amostra inicial. As classes Bacteroidia (49,9%), Clostridia (11,97%) e Betaproteobacteria (7,23%) foram identificadas em maior proporção na amostra final. Nesta mesma avaliação genômica, 209 gêneros diferentes foram identificados nas amostras AI e AF. As bactérias do gênero *Syntrophomonas*, *Sulfurimonas*, *Syntrophus*, *Cloacamonas* ocorreram em maior proporção na AI comparando com a AF. O gênero *Bacteroides* (pertencentes a família *Comamonadaceae*), uma OTU pertencente a ordem Pedosphaerales, as OTUs vadinHB04 e BSV43 pertencentes à família *Veillonellaceae* ocorreram em maior proporção na AF comparada a AI. Quatorze arqueas foram identificadas em ambas as amostras, dentre elas destacaram-se *Methanobacterium*, *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, variando nas suas proporções, como pode ser observado na Tabela 7. Verificou-se um aumento na classe Bacteroidia, da amostra AI para a AF em aproximadamente quatro vezes, e também foram identificadas em outros trabalhos, em reator metanogênico no tratamento de resíduos de fazendas de gado, podendo estar relacionados à fermentação da glicose, produzindo acetato e propionato (NISHIYAMA et al., 2009; UEKI et al 2008). Do mesmo modo, em trabalho realizado por Chen et al. (2016), em amostras de reatores anaeróbios tratando resíduos animais, foram encontrados Firmicutes e Bacteroidetes como filos predominantes.

A microbiota da amostra em 336h selecionou uma variedade menor de arqueas e duas delas tiveram um aumento de proporção: a OTU *VadinCA11* e o gênero *Methanosarcina*. Tsushima et al. (2010) relatou a presença de *Methanospirillum* e relacionou com um aumento significativo da atividade metanogênica a 20 ° C. O gênero *Methanosaeta* foi encontrado em outros trabalhos relacionados a digestão anaeróbia, como em trabalho de análise da comunidade microbiana de 22 digestores anaeróbios, este foi o gênero dominante nesses digestores (Raskin et al 1995). Em trabalho realizado por Riviere et al. (2009), com reatores anaeróbios para produção de biogás em grande escala, através de clone de genes 16S rRNA, encontraram OTU's de arqueas afiliadas a grupos filogenéticos *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Crenarcheota* e *Arc I*.

Os membros do gênero *Methanosarcina*, gênero encontrado na amostra do pico de produção (0,37%) deste estudo, são reconhecidos como principais metanogênicos acetoclásticos, que se desenvolvem em meio de cultura com baixo teor de sal e pH neutro a temperaturas mesofílicas (Maestrojuaín, Boone 1991). Conforme España-Gamboa et al.

(2012), os microrganismos da ordem Methanobacteriales e Methanosarcinales foram identificados em reator UASB tratando vinhaça de etanol, e favoreceram a produção de metano. Esses grupos também foram identificados na Amostra Inicial e Final deste estudo.

4 CONCLUSÕES

A avaliação das atividades metanogênicas mostrou que o bioensaio sem o acréscimo (SE) de meio basal Zinder no lodo ambientado teve maior eficiência na geração do metano em 236 h, na $S_0/X_0=1,5$ com o valor de 12,48 mmol/g DQO; com relação ao lodo ambientado com meio basal Zinder. Para formação de ácidos e posterior recuperação para aproveitamento dos mesmos, a relação $S_0/X_0=1,7$ com inóculo previamente ambientado com meio Basal Zinder foi mais efetiva.

Com relação à microbiota, nem todos os microrganismos presentes puderam ser identificados à nível de gênero. Entretanto uma grande variedade foi identificada através do sequenciamento de nova geração, mostrando haver diferenças nas comunidades microbianas de AI e AF. Na amostra do pico de produção de metano (AF), foram identificados como predominantes bactérias do Filo Bacteroidetes, um gênero pertencente à família *Bacteroidaceae* (*Bacteroides*) e uma OTU pertencente à Família *Porphyromonadaceae*. Referente às arqueas, as mais predominantes no AF foram os gêneros *Methanobacterium*, *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, pertencentes ao filo Euryarchaeota.

ACKNOWLEDGEMENTS

Agradecemos ao apoio da UCS e financiamento da Petrobras.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, S.; CHERNICHARO, C.A.L. (2005). **Build up of volatile fatty acids (VFA) in anaerobic reactors under stress conditions: causes and control strategies**. Engenharia Sanitária Ambiental, 10: 152-161.
- BRASIL. **Anuário Estatístico da Agroenergia**. Brasília, 2015. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/anuario_agroenergia_WEB_small.pdf. Acesso em: 18 dez. 2016.
- DÖLL, M. M. R.; FORESTI, E. Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35 C. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 275-282, 2010.
- DUBOIS, M., GILLES, A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28: 350-355.
- ELFERINK, S.; VISSER, A.; POL, L.W.H.; STAMS, A.J.M. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. **Fems Microbiology Reviews**. v.15, p.119-136, 1994.

ESPAÑA-GAMBOA E., MIJANGOS-CORTÉS J.O., HERNÁNDEZ-ZÁRATE G., MALDONADO J.A.D, ALZATE-GAVIRIA L.M: Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 82, 2012.

HAJARNIS, S.R., RANADE, D. R. Effect of propionate toxicity on some methanogens at different pH values and in combination with butyrate. Proceeding of 7th International Symposium on Aerobic Digestion, Cape Town, South Africa, 1994.

IMACHI H, SAKAI S, SEKIGUCHI Y, TSENG IC, OHASHI A, HARADA H, KAMAGATA Y. (2009). Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4892-4896, 2009

LAY, J.J.; LI, Y.; NOIKE, T. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. **Water Research**, v. 31, n. 6, p. 1518-1524, 1997.

MAESTROJUAN, G. M., D. R. BOONE. Characterization of *Methanosarcina barkeri* MST and 227, *Methanosarcina mazei* S-6T, and *Methanosarcina vacuolata* Z-761T. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 267-274, 1991.

NISHIYAMA, T., UEKI, A., KAKU, N., WATANABE, K., UEKI, K. *Bacteroides graminisolvans* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattlewaste. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 8, p. 1901-1907, 2009.

PULLAMMANAPPALLIL, P. C., CHYNOWETH, D. P., LYBERATOS, G., SVORONOS, S. A. (2001). Stable performance of anaerobic digestion in the presence of a high concentration of propionic acid. **Bioresource technology**, v. 78, n. 2, p. 165-169, 2001.

RASKIN L., ZHENG D.D., GRIFFIN M. E., STROOT P. G., MISRA P. Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, n. 4, p. 297-308, 1995.

SATYAWALI Y. E BALAKRISHANAN M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of Environmental Management*, 86; 2008; p.481-497.

SOARES, H.M. Digestão anaeróbia de efluentes de fábricas de cervejas e refrigerantes em reator tipo fluxo ascendente com manta de lodo (UASB). Dissertação (mestrado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 1990.

TSUSHIMA I, YOOCHATCHAVAL W, YOSHIDA H, ARAKI N, SYUTSUBO K. (2010). Microbial community structure and population dynamics of granules developed in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors for the anaerobic treatment of low-strength wastewater at low temperature. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 45, n. 6, p. 754-766, 2010

RIVIERE, D., DESVIGNES, V., PELLETIER, E., CHAUSSONNERIE, S., GUERMAZI, S., WEISSENBACH, J., SGHIR, A. **Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge.** The ISME journal, v. 3, n. 6, p. 700-714, 2009.

UEKI, A., ABE, K., KAKU, N., WATANABE, K., UEKI, K. (2008). *Bacteroides propionicifaciens* sp. nov. , isolated from rice-straw residue in a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 2, p. 346-352, 2008.

VAZZOLER, R.F. Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaerobio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas . Tese (Doutorado em Hidráulica e saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, 1995. 295p.

ZINDER, S.H.; KOCH, M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Archives of Microbiology, Heidelberg*, v. 138, p. 263-272, 1984.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos da vinhaça utilizada nos bioensaios.

Parâmetros	Quantidade
Cálcio total (mg Ca.L ⁻¹)	364,80
DQO (mgO ₂ .L ⁻¹)	20.840
Fósforo total (mg P.L ⁻¹)	58,79
Magnésio total (mg Mg.L ⁻¹)	169,92
Nitrogênio Amoniacal (mg. L ⁻¹)	38,97 ± 0,16
Nitrogênio total kjeldahl* (mg NH ₃ -N.L ⁻¹)	394,69
Ph	4,22
Potássio (mg K . L ⁻¹)	2.537,65
Sódio (mg Na. L ⁻¹)	50,47
Sulfetos	n.d.
Sólidos Suspensos Totais (mg. L ⁻¹)	3.480
Sólidos Suspensos Voláteis (mg. L ⁻¹)	2.860
Sólidos Suspensos Fixos (mg. L ⁻¹)	250

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos dos bioensaios com diferentes relações S₀/X₀

Experimentos	SVT (mg.L ⁻¹)	mDQO (mg O ₂)	Relação S ₀ /X ₀ (kg DQO.kgSVT ⁻¹)	COV (kg DQO.m ⁻³)
1	10.000	25.000	0,5	5,0
2	10.000	50.000	1,0	10,0
3	10.000	75.000	1,5	15,0
4	10.000	85.000	1,7	17,0

Tabela 3: Parâmetros estimados utilizando o modelo de Gompertz modificado, para os ensaios com prévia ambientação sem meio nutritivo (SE) e com meio basal Zinder (CE), na conversão de vinhaça em metano por consórcios microbianos em diferentes relações S₀/X₀.

	Relação S ₀ /X ₀	P (mL CH ₄)	R _{max} (mL CH ₄ /h)	λ (h)
SE	0,5	286,39 ± 7,37	18,52 ± 0,62	96,99 ± 0,003
	1	363,73 ± 9,28	2,10 ± 0,06	22,38 ± 2,37
	1,5	613,70 ± 2,96	1,91 ± 0,11	59,34 ± 3,79
	1,7	308,51 ± 50,04	2,72 ± 1,5	23,15±-2,646
CE	0,5	322,79 ± 49,48	55,79 ± 45,36	19,64 ± 3,79
	1,0	324,76 ± 59,48	27,94 ± 41,52	18,65 ± 3,82
	1,5	311,91 ± 54,80	54,63 ± 1,54	18,34 ± 4,05
	1,7	166,78 ± 0,84	1,98 ± 0,69	17,52 ± 1,02

Tabela 4: Consumo de carboidratos (mg.L^{-1}) no bioensaio de produção de metano a partir de diferentes relações S_0/X_0 de vinhaça com prévia ambientação sem meio nutritivo (SE) ; e com meio basal *Zinder* (CE)

	Relação S_0/X_0	0h	168h	336h	Consumo (%)
SE	0,5	32,81	12,41	10,20	68,90
	1,0	84,38	30,54	23,02	72,71
	1,5	103,44	24,77	22,15	78,58
	1,7	100,81	16,90	10,78	89,30
CE	0,5	209,85	31,65	28,5	86,42
	1,0	153,44	22,67	12,06	92,14
	1,5	174,07	39,92	42,25	75,72
	1,7	484,32	94,35	68,13	85,93

Tabela 5: Remoção da DQO nos bioensaios a partir de diferentes relações S_0/X_0 de vinhaça com prévia ambientação sem meio nutritivo (SE) ; e com meio basal *Zinder* (CE) .

	Relação S_0/X_0	Inicial (0h)	Final (336h)	Remoção de DQO (%)
SE	0,5	3448,61	701,41	79,66
	1,0	4442,28	2513,4	43,42
	1,5	5260,59	4091,57	22,22
	1,7	8943,01	5728,20	35,94
CE	0,5	10.134	1.921	81,04
	1,0	4.947,17	2.401,54	51,46
	1,5	7.492,80	4.658,98	37,82
	1,7	17.233,43	14.351	16,72

Tabela 6: Gênero de arqueas encontradas nas amostras inicial e final, da fermentação da vinhaça conforme relação $S_0/X_0 = 1,5$.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	AI (%)	AF(%)
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>	5,88	1,69
Euryarchaeota	Thermoplasmata	E2	[<i>Methanomassiliicoccaceae</i>]	vadinCA11	0,35	0,98
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	3,33	0,60
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	0	0,37
Euryarchaeota	Thermoplasmata	E2	[<i>Methanomassiliicoccaceae</i>]	-	0,84	0,35
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	<i>Methanoregulaceae</i>	<i>Methanolinea</i>	1,58	0,13
Euryarchaeota	Thermoplasmata	E2	[<i>Methanomassiliicoccaceae</i>]	-	1,91	0,13
Euryarchaeota	Thermoplasmata	E2	[<i>Methanomassiliicoccaceae</i>]	<i>Methanomassiliicoccus</i>	1,58	0,13
Crenarchaeota	MCG	pGrfC26	-	-	1,91	0,13
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	-	-	1,64	0,11
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>	0,02	0,01
Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanomethylovorans</i>	0,02	0
Crenarchaeota	MCG	-	-	-	0,03	0
Crenarchaeota	Thermoprotei	-	-	-	0,01	0

Figura 1: Quantidade em mmol de metano / g DQO consumida nos ensaios de fermentação utilizando vinhaça como substrato, conforme relação $S_0/X_0 = \bullet 0,5$, $\blacksquare 1,0$; $\blacktriangle 1,5$; $\blacktriangledown 1,7$, a) sem enriquecimento do inóculo (SE); b) com enriquecimento do inóculo (CE).

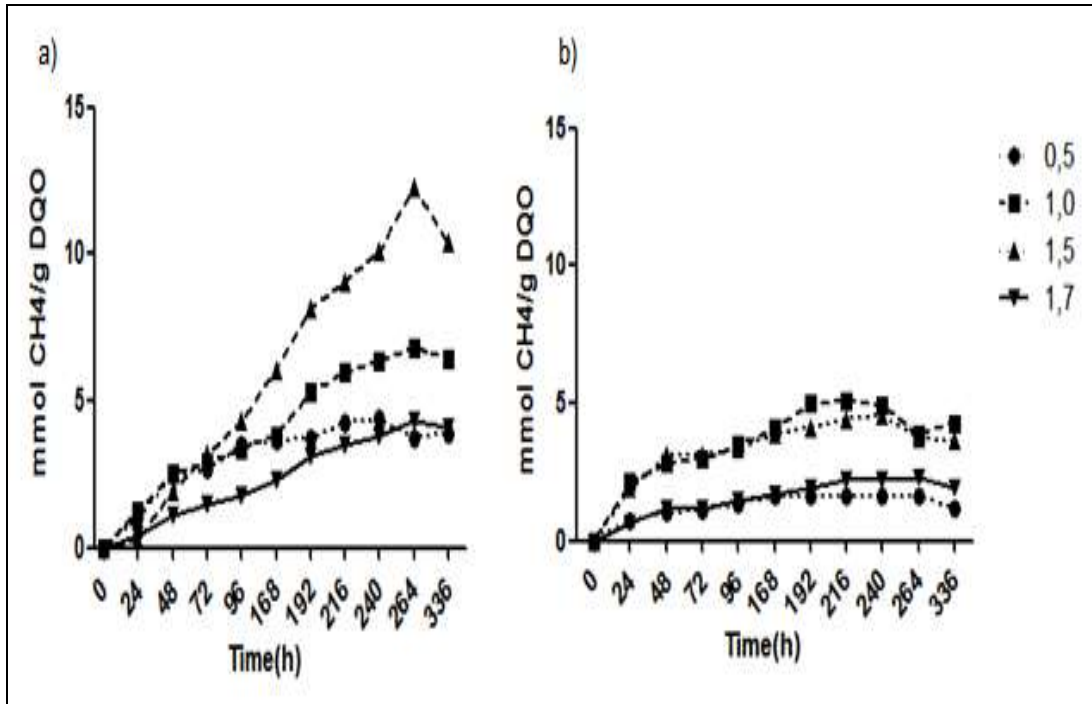


Figura 2: Produção e consumo de ácidos graxos voláteis nos ensaios de fermentação utilizando vinhaça como substrato: a) $S_0/X_0=0,5$; b) $S_0/X_0=1,0$; c) $S_0/X_0=1,5$; d) $S_0/X_0=1,7$ com prévia ambientação sem meio nutritivo (SE); e) $S_0/X_0=0,5$; f) $S_0/X_0=1,0$; g) $S_0/X_0=1,5$; h) $S_0/X_0=1,7$, com prévia ambientação com meio basal *Zinder* (CE).

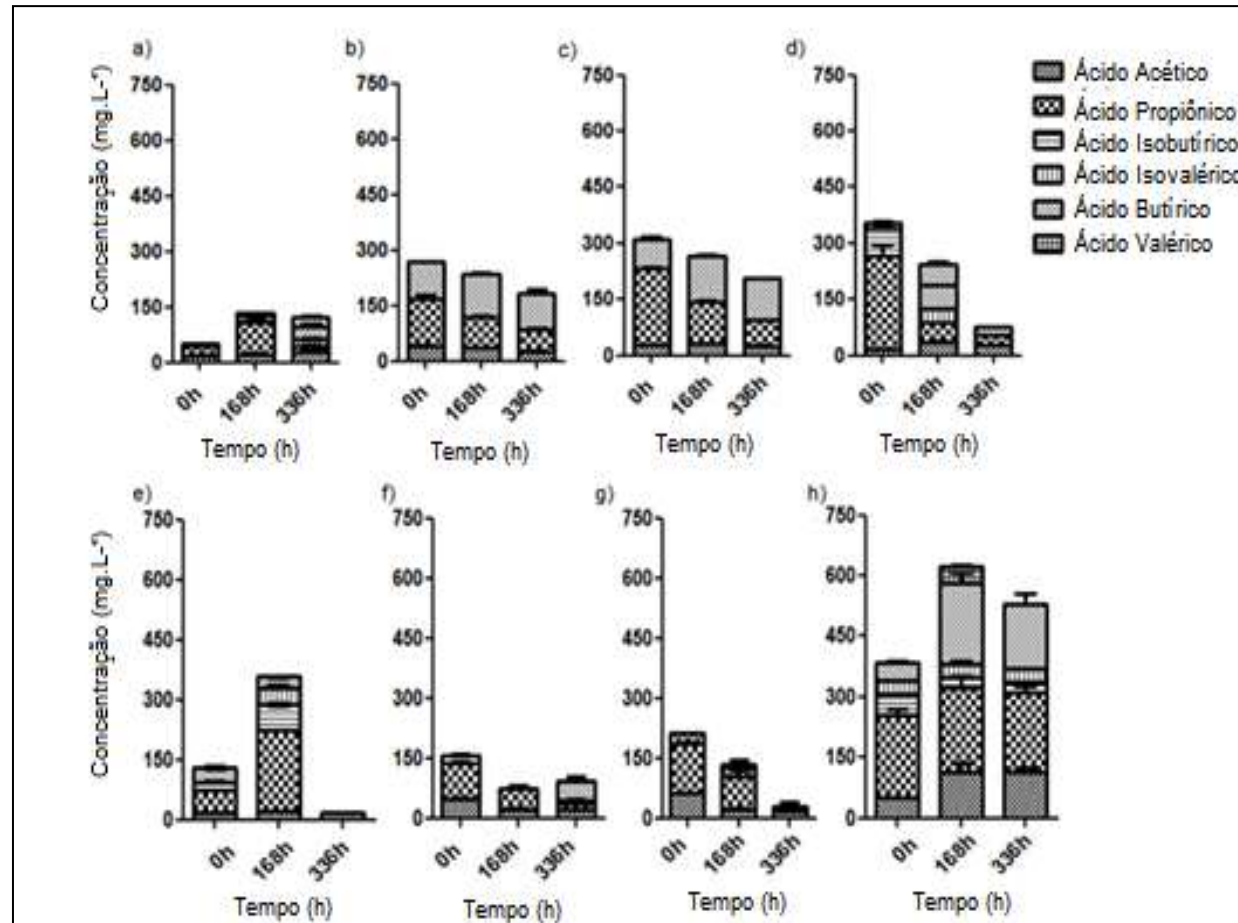
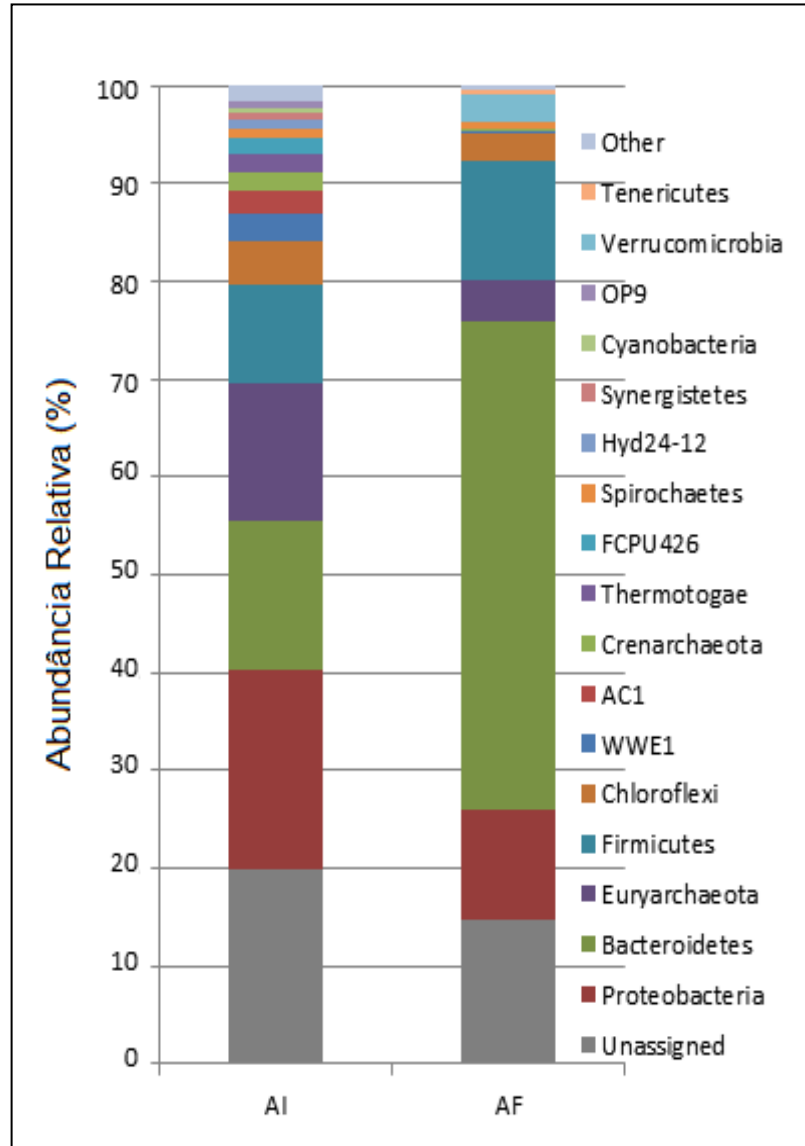


Figura 3: Filos identificados em amostra inicial e final da fermentação da vinhaça, conforme relação $S_0/X_0=1,5$.



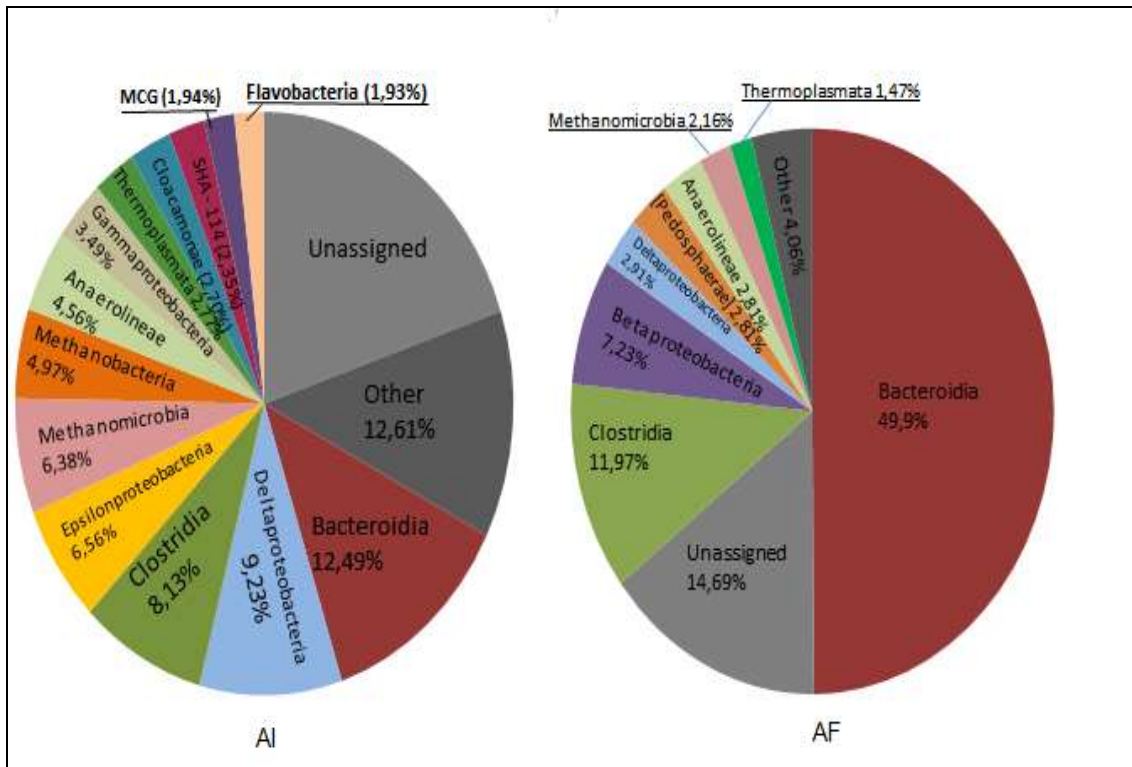


Figura 4: Classes de microrganismos presentes nas amostras inicial (AI) e final (AF) referentes ao biorreator $S_0/X_0=1,5$ sem enriquecimento do inóculo.

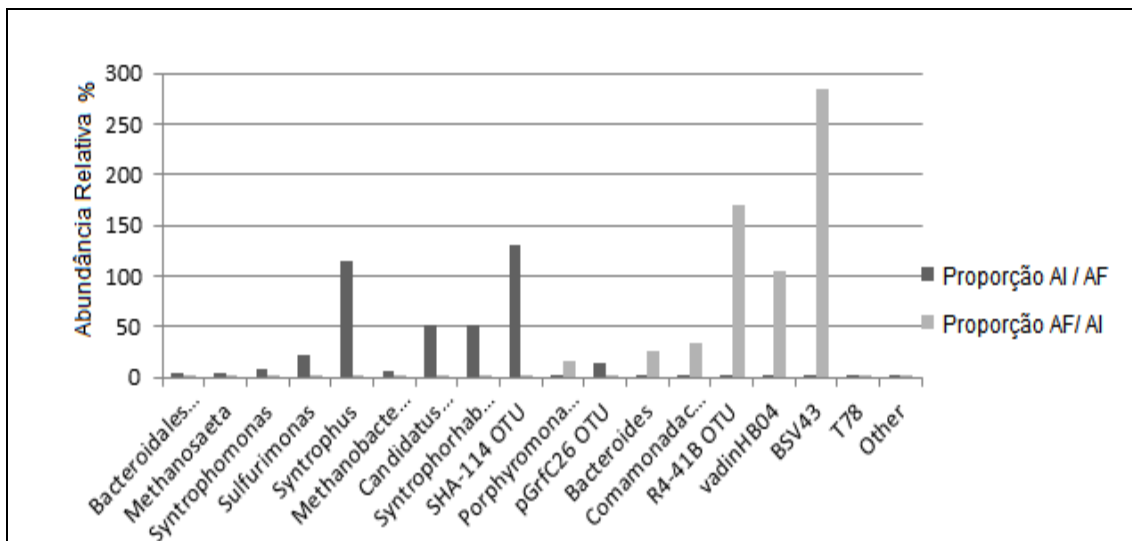


Figura 5: Proporção de gêneros de microrganismos predominantes amostras inicial (AI) e final (AF) referentes ao biorreator $S_0/X_0=1,5$ sem enriquecimento do inóculo.

5.3 Capítulo 3 Sequenciamento de alto desempenho como ferramenta para a identificação de bactérias e arqueas responsáveis pela produção de biogás a partir de vinhaça

Iltchenko, Janaina¹; Peruzzo, Vanessa²; Giongo, Adriana³; Torres, Ana Paula⁴; Beal, Lademir Luiz⁵, Paesi, Suelen⁶.

Correspondência do autor:

Universidade de Caxias do Sul, Instituto de biotecnologia, Laboratório de Diagnóstico Molecular, R. Travessão Solferino, 610-782. Bairro Cruzeiro, Caxias do Sul – RS. Endereço de Email: jiltchen@hotmail.com

RESUMO

O biogás consiste em uma mistura de compostos, principalmente metano, CO₂, H₂S, H₂ e N₂, podendo ser obtido através da digestão anaeróbia de variados substratos orgânicos como a vinhaça, que consiste em resíduo da produção de etanol, rica em nutrientes como cálcio, potássio e magnésio. Diversos microrganismos atuam no processo de fermentação, com destaque para bactérias e arqueas. Contudo, a identificação dessas comunidades microbianas é necessária para o entendimento e posterior otimização do processo. O presente trabalho tem como objetivo identificar a microbiota presente em diferentes etapas do processo de produção de biogás através de sequenciamento de alto desempenho (metabarcondings). Os testes foram conduzidos em reator de bancada operado com volume de 5L, com concentrações de inóculo e vinhaça conforme relação S₀/X₀= 0,25; 0,5; 0,75; 1 ; 1,25; 1,5 e 1,7. Verificou-se o teste mais efetivo para a produção de metano, a fim de identificar a microbiota presente em amostras inicial (0h), pico de produção de metano (18,22h) e final (243,77h) da fermentação, através do sequenciamento de alto desempenho (barcode). O experimento realizado com relação S₀/X₀=1,7 proporcionou a obtenção de maior produção de biogás, de 0,778 mmol CH₄. g SVT h⁻¹. Os ácidos orgânicos encontrados nas amostras desta relação (S₀/X₀=1,7) - acético, propiônico e isobutírico - foram consumidos totalmente em cerca de 25h de fermentação. As amostras analisadas revelaram um total de 181 gêneros de bactérias, onde Bacteroidetes (22,63%), Euryarchaeota (19,94%) e Firmicutes (16,33%) mostraram predominância no pico de produção de metano. Grupos de arqueas também foram identificados, um total de 13 gêneros, sendo *Methanosaeta* e *Methanobacterium* os mais predominantes. Com este estudo, pode-se observar uma rica diversidade de microrganismos presentes em amostras inicial, pico de produção e final do processo, possíveis interações sintróficas entre microrganismos, e gêneros de arqueas diretamente relacionadas a produção de metano. Estudos adicionais são necessários para determinar a função específica dos grupos de microrganismos que atuam no processo de produção de biogás a partir da vinhaça.

Palavras-chave: arqueas, vinhaça, biogás, metano, sequenciamento de alto desempenho.

ABSTRACT

Biogas consists of a mixture of compounds, mainly methane, CO₂, H₂S, H₂ and N₂, and can be obtained through the anaerobic digestion of various organic substrates, such as vinasse, which consists of a residue of ethanol production rich in nutrients such as calcium, potassium and magnesium. Several microorganisms work in the fermentation process, with emphasis on bacteria and archaea. However, in order to optimize the biogas production process. In this context, this work aims to identify a microbiota present in different stages of the methane production process through high performance sequencing (metabarcondings). The tests were conducted in a 5L volume operated reactor, with inoculum and vinasse concentrations, according to S₀ / X₀ = 0.25; 0.5; 0.75; 1 ; 1.25; 1.5 and 1.7. The test that produced the best methane was verified in order to identify the microbiota present in samples (0h), peak methane (18,22h) and final (243,77h) fermentation through high performance sequencing (Barcode). The experiment performed with S₀ / X₀ = 1.7 gave the highest biogas production, 0.778 mmol CH₄. G SVT h-1. The organic acids found in the samples of this ratio (S₀ / X₀ = 1,7) - acetic, propionic and isobutyric - were totally consumed in about 25h of fermentation. The analyzed samples revealed a total of 181 genera of bacteria, where Bacteroidales (21,8%) and Syntrophorhabdaceae (9,84%) predominated in the initial sample; Bacteroidetes (22.63%), Euryarchaeota (19.94%) and Firmicutes (16.33%) in the peak production sample and Firmicutes (17.04%), Tenericutes (14.39%) and Bacteroidetes 28%) in the final sample. Archaea groups were also identified, a total of 13 genera, being Methanosaeta and Methanobacterium as predominant genera. In this study, we can observe a rich diversity of microorganisms present in initial samples, production peak and end of the process, possible syntrophic interactions between microorganisms, and archaic genera directly related to methane production. Further studies are needed to determine the specific function of the groups of microorganisms that act in the biogas production process from the vinasse.

Keywords: archaea, vinasse, biogas, methane, barcode.

INTRODUÇÃO

O etanol é um combustível fabricado a partir de matéria prima vegetal, principalmente cana de açúcar. No seu processo de produção, são gerados resíduos em grande quantidade, como a vinhaça, que possui um alto potencial poluidor e, se descartada de forma incorreta no meio ambiente, pode causar sérios prejuízos, como a desertificação do solo e contaminação de lençóis freáticos. Como forma de reaproveitamento desse resíduo, destaca-se a produção de biogás através da digestão anaeróbia, que consiste em uma sequência de reações bioquímicas realizadas via ação de diversas bactérias e arqueas, em condições anaeróbias. No

processo, substâncias orgânicas complexas são decompostas pela população microbiana em moléculas mais simples, resultando na formação de compostos como metano e dióxido de carbono. Esse processo inclui etapas de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese como etapa final do processo. A digestão anaeróbia traz como vantagem a produção de biogás, um combustível de alta energia que pode ser utilizada para produzir energia sustentável. Como a maioria das bactérias é desconhecida e incultivável, técnicas moleculares são necessárias a fim de identificá-las. O metabarcoding é um método de análise da biodiversidade que combina a taxonomia e o sequenciamento do DNA de alto desempenho. Com isso, o objetivo desse trabalho é identificar microrganismos que atuam na etapa inicial do processo, no pico da produção de metano e final da fermentação através do método de sequenciamento de alto desempenho, a fim de conhecer os microrganismos que atuam no processo, e assim potencializar a produção de metano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Substrato e Inóculo

A vinhaça foi utilizada como substrato, cedida pela indústria de etanol Guarani (Unidade Industrial Andrade – Pitangueiras/SP). O inóculo utilizado foi lodo granular anaeróbio proveniente de reator anaeróbio da estação de tratamento de efluentes da indústria de óleo vegetal (Esteio, RS, Brasil). O lote de vinhaça e lodo granular foram coletados em setembro de 2015, sendo mantidos em câmara fria, a 4°C, no Laboratório de Tecnologias Ambientais da UCS.

Descrição do reator anaeróbio

Os testes foram conduzidos em reator de bancada (New Brunswick BioFlo/CelliGen 115 USA), com volume total de 7,5 L. O reator foi operado com volume de 5L de meio e a agitação foi proporcionada por três turbinas de seis lâminas planas (Rushton). O reator contém um conjunto com quatro chicanas equidistantes, com 20 mm de largura cada uma. A unidade de controle do equipamento permitiu a determinação e manutenção dos parâmetros, tais como pH, temperatura e ORP (Potencial de Oxirredução). O eletrodo de pH foi calibrado com soluções tampão com valores de pH de 4,0 e 7,0, e o controle deste parâmetro foi

feito automaticamente com a adição de NaOH (6 mol.L⁻¹) ou H₂SO₄ (1 mol.L⁻¹). A temperatura foi mantida a 35°C através da circulação da água na camisa da cuba do reator, proporcionada por uma bomba acoplada ao fermentador. O eletrodo de ORP foi calibrado com solução tampão de 229 mV. O reator é controlado por um *software* (Biocommand), que possibilita o armazenamento de dados durante os ensaios. Os parâmetros físicos químicos utilizados nos testes (sólidos voláteis totais, DQO, relação S₀/X₀ e COV) seguiram conforme Tabela 1.

Bioensaios para a produção de biogás

Os ensaios foram realizados na seguinte ordem: i) adição do lodo no reator e água potável; ii) substituição do ar atmosférico contido no *headspace* do reator por “stripping” utilizando gás nitrogênio; iii) ambientação do consórcio microbiano por um período de 24 h; iv) alimentação dos reatores com vinhaça e substituição do ar atmosférico por nitrogênio. As coletas de amostras do biogás gerado foram realizadas imediatamente após a adição de substrato e periodicamente até o final do experimento. Foram também avaliadas a formação de subprodutos na fase líquida ao longo de todo experimento, sólidos suspensos voláteis ao final do ensaio assim como DQO inicial e final.

Cinética da produção de metano

Para determinar a cinética de produção de metano, foram plotados os dados experimentais (PERUZZO et al. 2017), relativos ao volume acumulado de metano (mL) em função do tempo (h) e, então, definida uma função polinomial que descrevesse o comportamento da produção de metano em relação ao tempo (Eq.1 e Eq. 2).

$$y = f(x) \tag{1}$$

$$P (CH_4) = f(t) \tag{2}$$

Onde:

P (CH₄) = Produção de CH₄ (mL);

t = tempo (h)

Após esta modelagem, foi realizada a derivada da função polinomial para a obtenção de dados relativos à taxa máxima de produção de metano (Eq. 3).

$$\frac{\Delta P_{CH_4}}{\Delta t} = P'(CH_4) = f(t) \quad (3)$$

Onde:

ΔP_{CH_4} : produção acumulada de CH_4 (mL)

Δt : intervalo de tempo (h)

A determinação da atividade metanogênica foi realizada através do método da maior tangente, modelando-se a curva de produção de metano (volume de metano x tempo), utilizando uma função polinomial adequada. A partir da derivada desta função, obtém-se valores dos pontos tangentes à curva polinomial e o maior valor da tangente foi utilizado (taxa máxima de produção de metano) (Eq. 4).

$$AM = \frac{\Delta P_{CH_4}}{\Delta t \cdot SVT} \quad (4)$$

Onde:

AM: atividade metanogênica (mL CH_4 .mg SVT.h⁻¹)

SVT: sólidos voláteis totais (mg.L⁻¹)

Determinação da concentração de Ácidos Graxos Voláteis (AGV):

A partir de amostras do teste com a melhor produção de metano, foram analisados os ácidos graxos voláteis (ácido acético, propiônico e iso-butírico) em cromatografia de fase gasosa (GC/MS, Shimadzu- QP 2010 Ultra), equipado com coluna DN- FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m) com detector de ionização de chama (FID - *Flame Ionization Detector*), tendo Hélio como gás de arraste e ar sintético e nitrogênio como gases auxiliares. A temperatura da coluna foi 100°C por 5 min, aumentando 7°C por min até 200°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 200 e 250°C, respectivamente.

Extração de DNA e PCR

Foram avaliadas a microbiota das amostras inicial (0h), amostra do pico de fermentação (18,22h) e amostra final (243,77h) do bioensaio com melhor produção

de metano. A extração de DNA e PCR foram realizados no Laboratório de Diagnóstico Molecular – UCS. O DNA genômico foi extraído a partir de 250µl de amostra, com o kit de extração *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories, E. U. A.), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Alíquotas de 2,0 µl do DNA extraído das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0% (75 volts, 35 minutos). Quick Load DNA Marker (100-5000 pb, *Bio Labs*) foi utilizado como marcador de massa molecular. Após a eletroforese, o gel foi observado em transluminador de luz UV e as imagens obtidas por um sistema de captura de imagens. A técnica da PCR foi utilizada para a amplificação do DNA extraído de todas as amostras com *primers* universais 806R e 515F (Bates et al., 2011), utilizando o *kit* Phusion EO553L.

Análise de metabarcoding

As amostras inicial (0h), pico de produção de metano (18,22h) e final (243,77h) foram submetidas ao sequenciamento de alto desempenho utilizando a plataforma *Ion PGM System* (Thermo Fisher). A construção das bibliotecas foi realizada com o *kit Ion Plus Fragment Library* para amplicons curtos (≤ 350 pb), a partir de 100 ng de produto de amplificação. Foi adicionado um adaptador (*barcode*) do *kit Ion Xpress Barcode 1-16*, a cada amostra, para que as mesmas fossem sequenciadas na mesma corrida. Todos os procedimentos para a construção das bibliotecas foram realizados de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante. Para quantificação e equalização das bibliotecas, foi utilizado o *kit Ion Library Equalizer*. Para PCR em emulsão e passos de enriquecimento foi utilizado o *kit Ion PGM Template OT2 200*, com o equipamento *Ion OneTouch 2 System*. Para sequenciamento foi utilizado um chip *Ion 316*, com o *kit Ion PGM Sequencing 200 v2*, segundo o fabricante.

Análise do sequenciamento de alto desempenho:

Os fragmentos do gene 16S rRNA foram submetidos a um controle de qualidade que mantém as sequências com comprimento mínimo de 100 pb e remove bases de baixa qualidade ($\text{phred} < 30$), usando o programa PRINSEQ (Schmieder e Edwards, 2011). As sequências replicadas foram identificadas, classificadas e

filtradas para excluir sequências únicas, usando o programa USEARCH v7.0.1090 (EDGAR, 2010). Os *clusters* foram montados usando uma identidade mínima de 99% e quimeras foram removidas usando o banco de dados de referência RDP (COLE et al., 2014). A atribuição taxonômica foi obtida utilizando QIIME v1.7 (CAPORASO et al., 2010) com base de 97% de semelhança das sequências com o banco de dados GreenGenes 13.8 (DE SANTIS et al., 2006).

RESULTADOS

Atividade metanogênica e parâmetros de fermentação

Dentre os sete experimentos realizados com diferentes concentrações de vinhaça, destaca-se a maior produção de metano no experimento de acordo com a relação $S_0/X_0 = 1,7$; com o tempo de fermentação de 243,77h, atividade metanogênica de $0,778 \text{ mmolCH}_4.\text{gSVT h}^{-1}$, velocidade de produção de $872,02 \text{ mlCH}_4.\text{h}^{-1}$ e remoção de DQO de 82,0% (Tabela 2).

Produção de ácidos orgânicos

A produção dos ácidos acético, propiônico e isobutírico foi avaliada no teste com relação $S_0/X_0 = 1,7$ e foi observada uma variação na concentração dos ácidos gerados. A presença do ácido acético não foi registrada no tempo inicial (0h), mas foi observado um aumento após duas horas com $19,18 \text{ g/L}$ (Tabela 3). Foi observada alta produção de ácido propiônico no início do processo ($158,32 \text{ g/L}$), e foi consumido totalmente em 25,52h. O ácido isobutírico não mostrou variações, porém foi consumido em 18,22h.

Identificação microbiológica

A identificação de microrganismos que fazem parte de um consórcio produtor de metano é de grande importância biotecnológica, pois permite explorar os melhores padrões de produção. Amostras de DNA inicial em 0h, pico de produção de metano em 18,22h e amostra final (AF) em 243,77h do bioensaio $S_0/X_0 = 1,7$; foram extraídas e submetidas a sequenciamento de alto desempenho a fim de identificar os microrganismos a nível de gênero.

Através da análise metagenômica das amostras, um total de 330.449 sequências maiores que 100 pares de base (pb) com qualidade superior a 20, foram isoladas, entretanto somente 284.461 sequências se mostraram próprias para análise, com tamanho médio de 227,826.

A análise metagenômica revelou a presença de um total de 36 filós, havendo variações de comunidades entre os tempos de processo avaliados. Dentre os filós identificados (Figura 1), o filo Proteobacteria sobressaiu com 26,31%, seguido por Bacteroidetes como 23,97% e Firmicutes 7,49%, entretanto, destaca-se 23,82% de filós presentes na amostra sem identificação.

Em relação à amostra do pico de produção de metano, o consórcio foi composto principalmente pelos filós Bacteroidetes (22,63%), Euryarchaeota (19,94%) e Firmicutes (16,33%), entre outros menos expressivos, contudo houve uma proporção de 16,36% filós não identificados.

Na amostra final do processo, foi identificado aumento na proporção dos filós com identificação não conhecida (49,54%), seguido dos filós Firmicutes (17,04%), Tenericutes (14,39%) e Bacteroidetes (12,28%), entre outros. O filo Bacteroidetes esteve presente nas mesmas proporções na amostra inicial e na amostra de pico de produção, com a redução de 50% metade na amostra final.

Com relação ao filo Firmicutes, observou-se um aumento na proporção da amostra inicial (7,49%) para a amostra do pico de produção (16,33%), e do pico para a final (17,04%), manteve-se estável. O filo Proteobacteria mostrou uma redução significativa, de 26,31% na amostra inicial para 1,71% na amostra final. O filo Tenericutes teve grande desenvolvimento, de 1,95% na amostra inicial para 14,39% no final do processo fermentativo. Destaca-se a identificação de uma elevada proporção de Euryarchaeota.

Da mesma forma que os filós, durante o processo de produção de metano foi observada a variação em termos de classes (Figura 2). A predominância de Bacteroidia foi observada no início (23,87%) e no pico de produção (22,50%), decaindo para 12,28% no final do processo produção de metano. As proporções de Clostridia foram de 7,08 e 15,65% nas amostras inicial e no pico de produção, com valor relativamente estável, sendo identificado na AF (16,46%).

Com relação aos gêneros, foram identificados 194 diferentes gêneros, sendo 181 bactérias e 13 arqueas. Os microrganismos com maior ocorrência na etapa inicial foram relativos a dois grupos, pertencentes as ordens Bacteroidales (21,8%) e Syntrophorhabdaceae (9,84%). Na amostra do pico de produção de metano prevaleceu o gênero *Methanosaeta*, cerca de 15%, seguido por um gênero não identificado da Porphyromonadaceae, de 13,54% e *Candidatus Cloacamonas*, de 9,36%. A ordem Crostidiales foi mais pronunciada no final do processo, com 14,26%, e Porphyromonadaceae, em percentual de 8,77%, que esteve presente foi identificada na amostra do maior pico de metano, entre outras.

Avaliando mais especificamente as arqueas, as quais atuam na produção de metano, observou-se maior quantidade de metanogênicas acetotróficas (*Methanosaeta* - 15%), porém, maior diversidade de arqueas hidrogenotróficas, totalizando 5,56% de abundância no pico da fermentação (Tabela3).

Os microrganismos podem ser associados às diferentes fases da digestão anaeróbia: na fase hidrolítica da fermentação, atuam microrganismos pertencentes a Classe Bacteroidia, Clostridia e filo Tenericutes; atuantes na fase acidogênica são os microrganismos pertencentes aos gêneros *Paludibacter* e *Bacteroides*; associados a acetogênese, microrganismos da ordem Syntrophobacterales, Campylobacterales e Filo Sphyrochaetes (Ordem PL11B10). Na etapa da metanogênese propriamente dita, atuam as arqueas, dentre elas as pertencentes ao gênero *Methanobacterium* e *Methanosaeta* (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A identificação dos ácidos encontrados nas amostras de reator conforme relação se refere a fase acidogênica, onde há posterior conversão a acetato. Durante o processo fermentativo, a maioria das bactérias acidogênicas converte os produtos de hidrólise da matéria orgânica em ácidos orgânicos voláteis, álcoois, cetonas, dióxido de carbono e hidrogênio; limitando o processo se o substrato não for facilmente hidrolisado (MORAES, ZAIAT, BONOMI, 2015).

A composição do consórcio microbiano encontrado neste estudo é similar a outros estudos, como no trabalho desenvolvido Martinez et al (2014), com identificação de microrganismos associados ao tratamento anaeróbio de vinhaça foram obtidos de amostras de reator UASB, na qual foram predominantes: Firmicutes, Verrucomicrobia e Thermotogae; Synergistetes, Choloroflexi, Bacteroidetes e Proteobactérias ocorreram menos frequentemente.

Em trabalho realizado por Krieg et al. (2011), o filo Bacteroidetes é descrito como um grupo metabolicamente heterogêneo que compreende espécies com uma ampla gama de atividades celulares, tais como a hidrólise de polissacarídeos e proteínas, fermentação de açúcares e produção de ácidos, tais como ácido acético, propiônico, succínico e butírico. Acredita-se que este filo específico esteja envolvido nas etapas de hidrólise e acidogênese.

Microrganismos pertencentes à ordem Methanosarcinales, podem ser acetotróficos ou metilotróficos, capazes de metabolizar $H_2 + CO_2$, acetato e compostos de metila, como metanol e metilaminas (GARCIA, PATEL, OLIVIER, 2000).

Em reatores com alta concentração de ácidos graxos voláteis, Methanosarcinaceae também foram identificadas como dominantes. Três reatores mesofílicos tiveram melhor desempenho do que o esperado, dois apresentaram Methanosarcinaceae como organismos dominantes e Methanobacteriales como organismos não dominantes. Segundo os autores, outras comunidades não puderam ser identificadas e tiveram níveis moderados de ácidos graxos voláteis sob condições extremas de nitrogênio inorgânico (KARAKASHEV, BATSTONE e ANGELIDAKI, 2005).

Em uma variedade de reatores anaeróbicos com baixas concentrações de acetato, foi encontrado o gênero *Methanosaeta* (ZHENG, RASKIN, 2000). Relativamente, *Methanosaeta* foi encontrada em maior quantidade em biorreatores de lodo granular do que aqueles operados com lodo flocculante (DEMIREL, SCHERER, 2008).

Dentre os gêneros bacterianos encontrados, pode-se destacar também microrganismos sintróficos obrigatórios, como os pertencentes a Família Syntrophaceae que atuam em co-cultura com metanogênicas hidrogenotróficas;

Família Syntrophorhabdaceae, que oxidam compostos aromáticos a acetato, em simbiose com *Methanospirillum* ou *Dessulfovibrio*; e gênero *Syntrophus*, que degrada benzoato e ácidos graxos, e convivem em simbiose com microrganismos que utilizam hidrogênio/ formiato (ELSHAHED et al. 2001, CHEN et al. 2009; NOBU et al. 2014).

Esse estudo mostrou vários microrganismos que fazem parte dos consórcios que são eficientes na produção de metano, contudo, uma porção bem expressiva de microrganismos não identificados foi encontrada em todos os pontos da fermentação anaeróbia. A não identificação destes consórcios microbianos pode ser explicada, pois fazem parte de um grupo de bactéria e arqueas que não possuem suas sequências nucleotídicas depositadas em bancos genômicos pesquisados. Adicionalmente, para ser realizada uma pesquisa de metagenômica, o segmento de análise conta com baixo número de nucleotídeos para que possa realizar uma investigação ampla, no que se refere a amostras de consórcios. Quanto maior o segmento de DNA analisado, maior a especificidade genômica encontrada, porém diminuem as chances de identificação de outras classes, ordem e gêneros.

Diante da grande diversidade de microrganismos já relatados, era de se esperar que um grande número de microrganismos que participam de processo de produção de metano fossem desconhecidos, mostrando uma limitação de metodologia que tanto os identifique como também que esclareçam seu papel no metabolismo consorciado. Contudo, as classes, ordens, gêneros e até mesmo filos identificados dão início ao processo de identificação dos microrganismos de interesse acadêmicos e tecnológicos.

CONCLUSÕES

O teste realizado com reator em batelada, conforme relação $S_0/X_0=1,7$ mostrou uma produção de metano de $0,778 \text{ mmol CH}_4 \text{ g.SVT.h}^{-1}$ em 243,77h de experimento. Houve produção de ácidos acético, propiônico e isobutírico em até 20,47h.

A população de microrganismos identificados mostrou-se bastante diversificada, havendo uma predominância dos filos Proteobacteria e Bacteroidetes. As classes

mais prevalentes foram Bacteroidia e Clostridia; os gêneros mais predominantes foram Bacteroidales (AI), *Methanosaeta* (AP) e AF (Clostridiales). Com relação á comunidade de arqueas, 13 gêneros foram encontrados, dentre eles destacam-se *Methanosaeta* e *Methanobacterium*.

Estudos adicionais são necessários para verificar a função de cada microrganismo presentes no reator. No entanto pode-se destacar a relação sintrófica entre diversos microrganismos no processo da metanogênese, havendo diferenças entre as comunidades microbiológicas presentes em reator anaeróbio mesofílico, utilizando vinhaça como substrato.

REFERÊNCIAS

BATES, S. T., BERG-LYONS, D., CAPORASO, J. G., WALTERS, W. A., KNIGHT, R., FIERER, N. **Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil.** *The ISME journal*, v. 5, n. 5, p. 908-917, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/ismej/journal/v5/n5/pdf/ismej2010171a.pdf> Acesso em: 15/05/2016.

CAPORASO J.G KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., BITTINGER, K., BUSHMAN, F. D., COSTELLO, E. K., Huttley, G. A. **QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.** *Nature Methods*. v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v7/n5/full/nmeth.f.303.html> Acesso em 20/10/2016.

CHEN, C. L., WU, J. H., TSENG, I. C., LIANG, T. M., LIU, W. T. **Characterization of active microbes in a full-scale anaerobic fluidized bed reactor treating phenolic wastewater.** *Microbes and environments*, v. 24, n. 2, p. 144-153, 2009. Disponível em: < https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/24/2/24_ME09109/_pdf > Acesso em: 20/10/2016.

CHERNICHARO, C. A. L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores Anaeróbios. 2.ed. Belo Horizonte: Departamento de engenharia Sanitária e Ambiental, 2007.

COLE, J. R., WANG, Q., FISH, J. A., CHAI, B., MCGARRELL, D. M., SUN, Y., TIEDJE, J. M. **Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis.** *Nucleic acids research*, v. 42, n. D1, p. D633-D642, 2014.. <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/42/D1/D633> Acesso em: 20/10/2016.

DE SANTIS T.Z. HUGENHOLTZ, P., LARSEN, N., ROJAS, M., BRODIE E. L., KELLER, K., HUBER T., DALEVI D., HU, P., ANDERSEN, G. L. GreenGenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied Environment Microbiology*. 72: 5069-5072. 2006. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/72/7/5069.full.pdf+html>. Acesso em: 15/05/2016.

DE VRIEZE, J.; SAUNDERS, A. M.; HE, Y.; FANG, J.; NIELSEN, P. H.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. **Water research**, v. 75, p. 312-323, 2015.

DEMIREL, B; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 7, n. 2, p. 173-190, 2008.

EDGAR R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461.

ELSHAHED, M.S., BHUPATHIRAJU, V.K., WOFFORD, N.O., NANNY, M.A., MCINERNEY, M.J., 2001. Metabolism of benzoate, cyclohex-1-ene carboxylate, and

cyclohexane carboxylate by “*Syntrophus aciditrophicus*” strain SB in syntrophic association with H₂-using microorganisms. **Applied Environment Microbiology**. 67, 1728e1738

ESPAÑA-GAMBOA, E. I., MIJANGOS-CORTÉS, J. O., HERNÁNDEZ-ZÁRATE, G., MALDONADO, J. A. D., ALZATE-GAVIRIA, L. M. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. **Biotechnology for Biofuels**, 5(1), 82. 2012.

GARCIA, J. L., PATEL, B. K., OLLIVIER, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. **Anaerobe**, v. 6, n. 4, p. 205-226, 2000.

GRAY, N. D. C. M. CALLBECK, C. M. AITKEN, D. M. JONES, J. J. ADAMS, S. R. LARTER, I. M. HEAD. **The quantitative significance of Syntrophaceae and syntrophic partnerships in methanogenic degradation of crude oil alkanes**. *Environmental Microbiology*, v. 13, n. 11, p. 2957-2975, 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2011.02570.x/full>. Acesso em: 02/03/2017.

KARAKASHEV, D; BATSTONE, D. J.; ANGELIDAKI, I. **Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 331-338, 2005

KRIEG, N.R et al. **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology** Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes, second ed. Springer, New York, NY, 2010. pp. 25–469.

LEE, S. H., PARK, J. H., KIM, S. H., YU, B. J., YOON, J. J., PARK, H. D. **Evidence of syntrophic acetate oxidation by Spirochaetes during anaerobic methane production**. *Bioresource technology*, v. 190, p. 543-549, 2015.

MORAES, B. S., ZAIAT, M., BONOMI, A. **Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives**. v. 44, p. 888-903, 2015.

NARIHIRO, T., NOBU, M. K., KIM, N. K., KAMAGATA, Y., LIU, W. T. **The nexus of syntrophy-associated microbiota in anaerobic digestion revealed by long-term enrichment and community survey**. *Environmental Microbiology*, v. 17, n. 5, p. 1707-1720, 2015. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.12616/full> Acesso em: 03/03/2017.

NOBU, M. K., NARIHIRO, T., TAMAKI, H., QIU, Y.-L., SEKIGUCHI, Y., WOYKE, T., GOODWIN, L., DAVENPORT, K. W., KAMAGATA, Y., LIU, W. T. Draft genome sequence of *Syntrophorhabdus aromaticivorans* strain UI, a mesophilic aromatic compound-degrading syntroph **Genome announcements**, v. 2, n. 1, p. e01064-13,

2014. Disponível em: <http://genomea.asm.org/content/2/1/e01064-13.full.pdf+html>
Acesso em: 05/03/2007.

NOBU, M. K., NARIHIRO, T., KURODA, K., MEI, R., LIU, W. T. **Chasing the elusive Euryarchaeota class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen.** The ISME Journal, v. 10, n. 10, p. 2478-2487, 2016.

PERUSSO, V. V.; BEAL, L. L.; SACHET, F. H.; TORRES, A. P. R.; SOUZA, M. P. **Influence of different F/M ratios and organic volumetric load on anaerobic digestion of vinasse.** In XII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion, Cusco, Peru. 2017.

SCHMIEDER R, EDWARDS R (2011) **Quality control and preprocessing of metagenomic datasets.** Bioinformatics. v. 27, n. 6, p. 863-864, 2011 27: 863-4.

SIEGERT, M., LI, X. F., YATES, M. D., LOGAN, B. E. **The presence of hydrogenotrophic methanogens in the inoculum improves methane gas production in microbial electrolysis cells.** Frontiers in Microbiology, v. 5, p. 778, 2015.

SKENNERTON, C. T., HAROON, M. F., BRIEGEL, A., SHI, J., JENSEN, G. J., TYSON, G. W., ORPHAN, V. J. **Phylogenomic analysis of Candidatus 'Izimaplasma' species: free-living representatives from a Tenericutes clade found in methane seeps.** The ISME Journal, v.10, p.2679-2692, 2016.

YANG, L., REN, Y. X., LIANG, X., ZHAO, S. Q., WANG, J. P., XIA, Z. H. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 227-233, 2015.

ZHENG, D.; RASKIN, L. Quantification of Methanosaeta Species in Anaerobic Bioreactors Using Genus- and Species-Specific Hybridization Probes. **Microbial ecology**, v. 39, n. 3, 2000.

6. FINANCIAMENTO

Essa pesquisa foi financiada pela PETROBRAS e UCS.

Tabela 1: Parâmetros físico-químicos relacionados aos testes de produção de biogás.

Experimentos	SVT (mg.L ⁻¹)	mDQO (mg O ₂)	Relação S ₀ /X ₀ (kg DQO.kgSVT ⁻¹)	COV (kg DQO.m ⁻³)
1	10.000	12.500	0,25	2,5
2	10.000	25.000	0,5	5,0
3	10.000	37.500	0,75	7,5
4	10.000	50.000	1,0	10,0
5	10.000	62.500	1,25	12,5
6	10.000	75.000	1,5	15,0
7	10.000	85.000	1,7	17,0

Tabela 2: Quantidade de ácidos presentes nas amostras AI (0h), AP (18,22h) e AF (243,77h).

Time (h)	Acetic acid (g/L)	Propionic acid (g/L)	Isobutyric acid (g/L)
0	0	158,3201	27,1419
1,9	19,18255	115,1738	28,73785
5,22	3,3965	83,83545	34,1889
18,22	4,63955	47,018	0
20,47	2,0261	0	0
25,52	0	0	0
243,77	0	0	0

Tabela 3: Análise de parâmetros físico-químicos de reator em batelada, conforme relação S₀ / X₀: 0,25; 0,5; 0,75; 1,25; 1,5; 1,7.

Experimento	Tempo do experimento (h)	Atividade metanogênica (mmol CH ₄ . g SVT h ⁻¹)	Velocidade de produção específica de metano (mL CH ₄ .h ⁻¹)	DQO inicial (mg O ₂ .L ⁻¹)	DQO final (mg O ₂ .L ⁻¹)	Eficiência de remoção de DQO (%)
1	48,5	0,3384	378,98	2.500	392,59	84,3
2	95,25	0,4971	556,74	5.000	837,26	83,3
3	97,02	0,5467	612,25	7.500	1.054,95	85,9
4	119,37	0,6596	738,75	10.000	1.773,43	82,3
5	230,67	0,6073	680,15	12.500	1.214,52	90,3
6	239,75	0,6110	684,31	15.000	2.342,43	84,4
7	243,77	0,7786	872,02	17.000	3.064,68	82,0

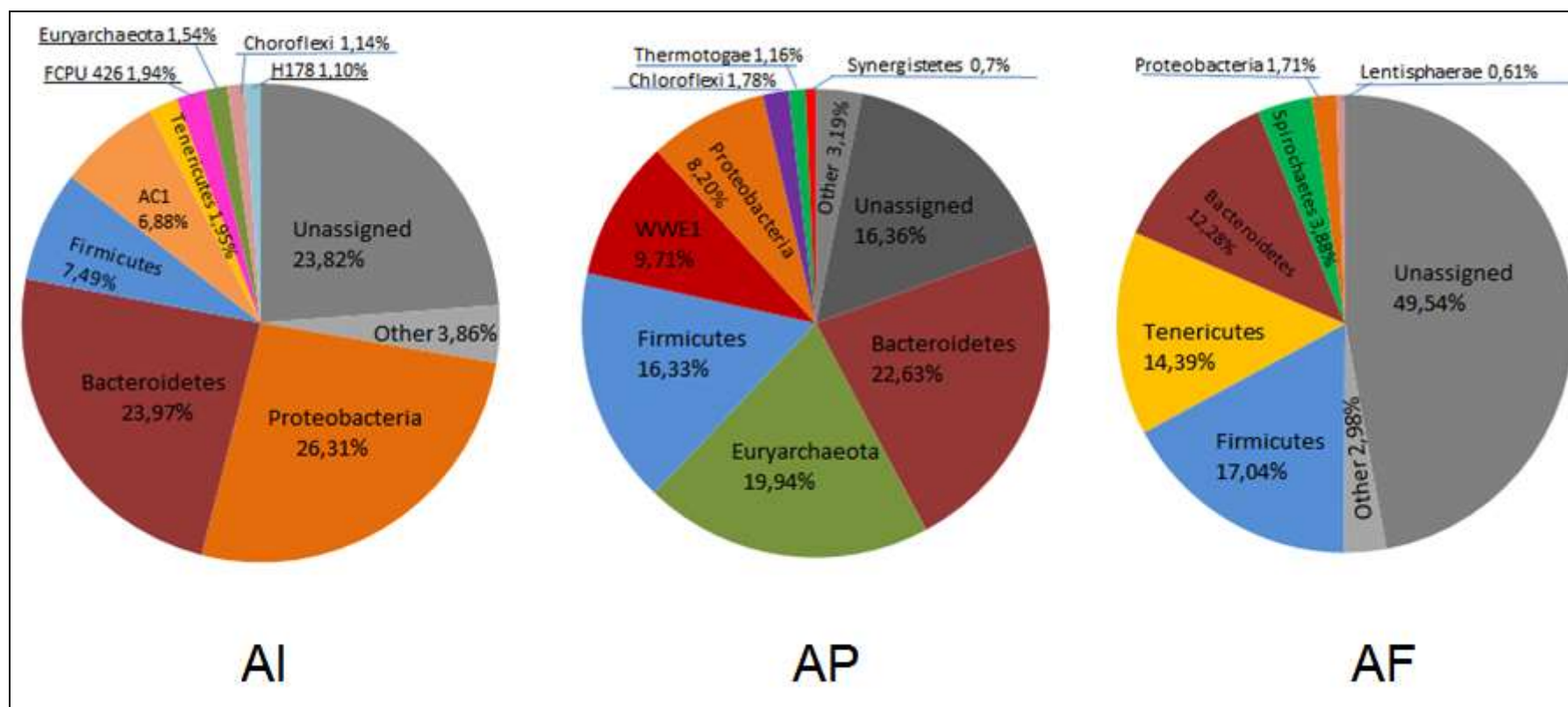


Figura 1: Porcentagem de abundância de filos de microrganismos de maior predominância na amostra inicial (AI), pico de metano (AP) e na mostra final (AF).

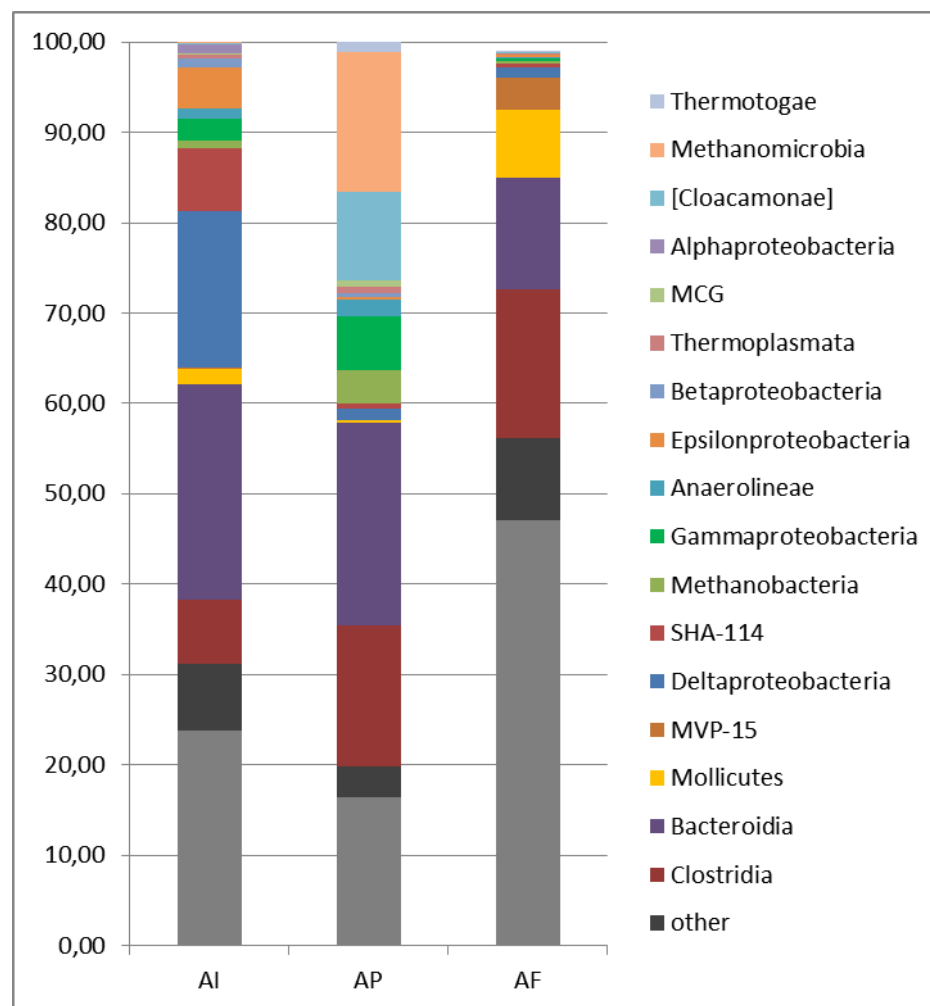


Figura2: Porcentagem de abundância de classes de microrganismos de maior predominância na amostra inicial (AI), pico de metano (AP) e na amostra final (AF).

Tabela3: Diversidade de bactérias e arqueas presentes nas amostras AI, AM e AF, nas principais etapas da fermentação, onde ^a via acetotrófica; ^b via hidrogenotrófica.

Class	Order	Family	Genus	AI	AP	AF	fase da metanogênese	Referência
Mollicutes	-	-	-	0,18	0,01	7	Hidrólise	(Skennerton et al.,2016)
RF3	ML615J-28	-	-	0,27	0,07	6,85	Hidrólise	(Skennerton et al., 2016)
Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	-	0,2	13,54	8,77	Hidrólise,	(Krieg et al.,2011)
Clostridia	Clostridiales	-	-	1,23	2,03	14,26	Hidrólise	(Garrity, 2001).
Mollicutes	RF39	-	-	1,17	0,02	0,05	Hidrólise	(Skennerton et al., 2016)
Clostridia	Clostridiales	Syntrophomonadaceae	Syntrophomonas	2,18	1,39	0,2	Hidrólise	(Garrity, 2001).
Bacteroidia	Bacteroidales	-	-	21,8	3,85	1,25	Hidrólise, acidogênese	(krieg et al.,2011)
Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	0,95	8,17	0,83	Acidogênese	(Garrity, 2001).
Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	0	2,63	0,63	Hidrólise, acidogênese	(Krieg et al.,2011)
Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophorhabdaceae	-	9,48	0,45	0,35	Acetogênese	
Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	-	3,09	0,24	0,29	Acetogênese	(Gray et al., 2011)
Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	Syntrophobacter	2,17	0,08	0,34	Acetogênese	(Juste-Poinapen et al.,2015)
Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	-	2,09	0,04	0,05	Acetogênese	(Juste-Poinapen et al.,2015)
[Cloacamonae]	[Cloacamonales]	[Cloacamonaceae]	Candidatus Cloacamonas	0,11	9,36	0,01	Acetogênese	(Juste-Poinapen et al., 2015)
Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales	Syntrophaceae	-	3,09	0,24	0,29	Acetogênese	(Gray et al., 2011)
Methanomicrobia	Methanosarcinales	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>	0,04	15	0	Metanogênese ^a	(De Vriese et al., 2015)
Methanobacteria	Methanobacteriales	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	0,75	2,23	0,16	Metanogênese ^b	(Demirel, Scherer, 2008)
Methanobacteria	Methanobacteriales	WSA2	-	0,18	1,46	0,11	Metanogênese ^b	(Demirel, Scherer, 2008)
MCG	pGrFC26	-	-	0,15	0,68	0,03	Metanogênese ^b	(Demirel, Scherer, 2008)
Thermoplasmata	E2	[<i>Methanomassiliococcaceae</i>]	<i>Methanomassiliococcus</i>	0,09	0,58	0,01	Metanogênese ^b	(Demirel, Scherer, 2008)
Methanomicrobia	Methanomicrobiales	<i>Methanoregulaceae</i>	<i>Methanolinea</i>	0,02	0,24	0	Metanogênese ^b	(Demirel, Scherer, 2008)
Thermoplasmata	E2	[<i>Methanomassiliococcaceae</i>]	-	0,13	0,18	0,01	Metanogênese ^b	(Demirel, Scherer, 2008)
Methanomicrobia	Methanomicrobiales	-	-	0,01	0,12	0,01	Metanogênese ^b	(Demirel, Scherer, 2008)
Methanomicrobia	Methanomicrobiales	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanospirillum</i>	0	0,07	0	Metanogênese ^b	(Demirel, Scherer, 2008)

6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Com relação ao objetivo específico 1, o pico ótimo para a produção de metano foi meio Zinder com acetato no 7^o dia, produzindo 7,6 mmol/CH₄ (meio Zinder e acetato) e no 10^o dia o valor de 5,5 mmol/CH₄ (meio Monteggia com acetato).

Com relação ao objetivo específico 2, verificou-se que o bioensaio sem a ambientação de inóculo com meio nutritivo (Zinder e acetato), em bioensaios contendo vinhaça, teve uma maior eficiência na geração do metano em 236 h, na $S_0/X_0=1,5$ com o valor de 12,48 mmol/g DQO. Em todos os ensaios observou-se um elevado consumo de carboidratos e remoção da DQO. A produção dos ácidos (acético, propiônico e butírico) foi superior nos experimentos com prévia ambientação do inóculo com meio basal *Zinder*. Esse processo de ambientação do inóculo não foi efetivo para otimizar a produção de metano, sendo que a produção de metano foi similar aos meios com inóculo ambientado sem meio nutritivo.

Com relação ao objetivo específico 3, uma grande variedade de microrganismos foi identificada através do sequenciamento de nova geração. Na amostra final, foram identificados como predominantes bactérias do Filo Bacteroidetes, um gênero pertencente à família *Bacteroidaceae* (*Bacteroides*) e uma OTU pertencente à Família *Porphyromonadaceae*, e gêneros de arqueas *Methanobacterium*, *Methanosaeta* e *Methanosarcina*, pertencentes ao filo Euryarchaeota. Houve predominância dos filos Proteobacteria e Bacteroidetes, classes Bacteroidia e Clostridia; e gêneros Bacteroidales (AI), Methanosaeta (AP) e AF (Clostridiales). Com relação a comunidade de arqueas, 13 gêneros foram encontrados, dentre eles destacam-se *Methanosaeta* e *Methanobacterium*.

Pode-se destacar a relação sintrófica entre diversos microrganismos no processo da metanogênese, havendo diferenças entre as comunidades microbianas. A técnica de sequenciamento de nova geração possibilitou a identificação de uma grande variedade de microrganismos, muitos deles incultiváveis, atuando de diferentes formas nos estágios inicial, meio e final da fermentação, proporcionando

uma estimativa de microrganismos existentes em cada fase, bem como uma possível função de cada grupo de acordo com a literatura.

É imprescindível a identificação dos microrganismos para que haja uma potencialização na produção do biogás verificando os microrganismos que atuam nas importantes fases que antecedem a metanogênese, e também para futuramente testar possíveis isolamentos dos microrganismos, e avaliar detalhadamente as funções de cada grupo na biodigestão.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10007. Resíduos sólidos: amostragem. Rio de Janeiro, 2004.

ABREU, E. F. **Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário**. 81p. Tese de Doutorado. Dissertação. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Escola de Engenharia da UFMG, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <<http://www.smarh.eng.ufmg.br/defesas/261M.PDF>> Acesso em: 15.10.2016.

ALPHENAAR, A.; **Granular Sludge Anaerobic: Characterization and Factors Affecting Its Functioning**. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands. p.5, 1994.

ANDRADE, E. T.; CARVALHO, S. R. G.; SOUZA, L. F. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. **Engvista**, V. 11, n. 2. p. 127-136, 2009.

ANP- Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. Produção de etanol. Disponível em: - <http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/DADOS_ESTATISTICOS/Producao_etanol/Producao-de-Etanol-m3.xls> Acesso em: 02/05/2017.

APHA. A.W.W.A. WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington: American Public Health Association. 1360 p. 2012.

AQUINO, S.F., CHERNICHARO, C.A.L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Revista Engenharia Sanitária Ambiental**, v.10 . pp. 152–161. 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-41522005000200009&script=sci_arttext&tIing=pt Acesso em: 03/05/2016.

AQUINO, S. F.; SILVA, S. Q.; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado a análise de efluentes anaeróbios. **Revista Engenharia Sanitária Ambiental**, v.11, pp. 296-305. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/esa/v11n4/a01v11n4.pdf> Acesso em: 15/05/2016.

ARCHER, D.B.; KIRSOP, B.H. The microbiology and control of anaerobic digestion. In: WHETLEY, A. (Ed.). *Anaerobic digestion: a waste treatment technology*, pp. 43-91, 1990.

BAIÃO, Raissa. **Ácido Acético: Tecnologias e Análise de Mercado**. Projeto de final de curso. Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria de Petróleo e Gás Natural, Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2015. Disponível em: http://sicbolsas.anp.gov.br/sicbolsas/Uploads/TrabalhosFinais/2010.3926-0/20150413-MONOGRAFIA_0.pdf Acesso em: 03/05/2016.

BARROS, V. G.; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A. Produção de biogás e remoção de DQO da vinhaça através de reatores uasb em série. **Ciência e Tecnologia**, v. 7, 2015. Disponível em: <http://citec.fatecjab.edu.br /index.php/files/article/view/606/604> Acesso em: 15/06/2016.

BATES, S. T., BERG-LYONS, D., CAPORASO, J. G., WALTERS, W. A., KNIGHT, R., FIERER, N.. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **The ISME Journal**, v. 5, n. 5, p. 908-917, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/ismej/journal/v5/n5/pdf/ismej2010171a.pdf> Acesso em: 15/05/2016.

BEAL, L.L. **Tratamento anaeróbio de efluente de curtume de acabamento associado à membranas de micro e ultrafiltração**. 313 f. Tese (Doutorado Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2004.

BOONE, D. R., CHYNOWETH, D. P., MAH, R. A., SMITH, P. H., WILKIE, A. C. . Ecology and microbiology of biogasification. **Biomass and Bioenergy**, v. 5, n. 3-4, p. 191-202, 1993.

BRIONES A, RASKIN L. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 270-276, 2003.

BROCHIER-ARMANET, C.; FORTERRE, P.; GRIBALDO, S. Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. **Current opinion in microbiology**, v. 14, n. 3, p. 274-281, 2011.

CAPORASO J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; HUTTLEY, G. A. **QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data**. *Nature Methods*. v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v7/n5/full/nmeth.f.303.html>. Acesso em 20/10/2016.

CARBALLA, M.; SMITS, M.; ETCHEBEHERE, C.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 2, p. 303-314, 2011.

CHERNICHARO, C.A.L.; **Reatores Anaeróbios- Princípios do Tratamento Biológico de Água Residuárias**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-UFMG. Vol.5. 2ª Edição ampliada. 2007.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.

COLE, J. R., WANG, Q., FISH, J. A., CHAI, B., MCGARRELL, D. M., SUN, Y., BROWN, C.T., PORRAS-ALFARO, A. , KUSKE C.R., TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, p.1244, 2013.

CORAZZA, R. I. Impactos ambientais da vinhaça: Controvérsias Científicas e Lock-In na Fertirrigação. In: 44th Congress, July 23-27, 2006, Fortaleza, Ceara, Brazil. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER), 2006.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. **Biomassa para energia**. São Paulo: Editora da UNICAMP, 2008.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canaveira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, Vol.2, Nº. 2, 1992.

COSTA, L. V. C. **Biodigestão anaeróbia da cama de frango associada ou não ao biofertilizante obtido com dejetos de suínos**: produção de biogás e qualidade do biofertilizante. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 89 f., 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/96558>> Acesso em : 14/11/2015.

DAMIANO, E. S. G. Tratamento da vinhaça em reator anaeróbio de leiteo fluidificado. Dissertação (Mestrado). EESC-USP, São Carlos. 98 p. 2005.

DE SANTIS T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE E. L. ; KELLER, K.; HUBER T.; DALEVI D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. GreenGenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Applied Environment Microbiology**. 72: 5069-5072. 2006 .Disponível em: <http://aem.asm.org/content/72/7/5069.full.pdf+html>. Acesso em: 15/05/2016.

DE VRIEZE, J., GILDEMYN, S., VILCHEZ-VARGAS, R., JÁUREGUI, R., PIEPER, D. H., VERSTRAETE, W., BOON, N. Inoculum selection is crucial to ensure operational stability in anaerobic digestion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 189-199, 2015.

DEUBLEIN, D., STEINHAUSER, A. **Biogas from waste and renewable resources**. An Introduction, First Ed. Wiley-Vch, Weinheim. 2008.

DIAZ-SANCHEZ, S.; HANNING, I.; PENDLETON, S.; D'SOUZA, D. Next-generation sequencing: the future of molecular genetics in poultry production and food safety. **Poultry science**, v. 92, n. 2, p. 562-572, 2013.

DOELSCH, E., MASION, A., CAZEVIEILLE, P., CONDOM, N. Characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation. **Waste Management**, v. 29, p. 1929–1935, 2009.

DUBÉ, C. D.; GUIOT, S. R. Direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion: a review. In: **Biogas Science and Technology**. Springer International Publishing, p. 101-115, 2015.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. T., SMITH, F. Colorimetric Method For Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

ERCOLINI, Danilo. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of microbiological methods**, v. 56, n. 3, p. 297-314, 2004.

FERREIRA, L.F.; AGUIAR, M. M.; MESSIAS, T.; POMPEU, G. B.; LOPEZ, Q. M. Q.; SILVA, D. P.; MONTEIRO, R. T. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators, **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Maryland Heights, v.74, n. 1, p. 132-137. 2011.

FOX, G. E.; PECHMAN, K. R.; WOESE, C. R. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 44-57, 1977.

FREIRE, W. J. CORTEZ, LAB Vinhaça de cana-de-açúcar. **Guaíba: Agropecuária**, p. 203, 2000.

GARCIA, J.L; PATEL, B.K. OLLIVIER, B. Taxonomic, Phylogenetic and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. **Anaerobe**, v.6, p. 205-226, 2000.

GONÇALVES, C.D.C. **Modelação do processo de digestão anaeróbia da FORSU à escala industrial**. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Técnico de Lisboa, 2012.p-21.

GODOY, V. A.. **Estudo dos mecanismos de transporte de sódio, fosfato e amônio em colunas indeformadas de material inconsolidado residual de arenitos da Formação Adamantina**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. p.8, 2013.

GRANATO, E. F. **Geração de energia através da biodigestão anaeróbia de vinhaça**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – Universidade Estadual Paulista, Bauru. 2003. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/itstream/handle/11449/90820/granato_ef_me_baurupdf?sequence=1&isAllowed=y Acesso em: 03/05/2016.

GUJER, W. ZENDER, A.J.B. Conversion Processes in anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, v.15. p.167. 1983.

HANSEN, K. H.; AHRING, B. K.; RASKIN,L. Quantification of syntrophic fatty acid- β -oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4767-4774. 1999.

HARADA, P.K. **Produção de ácido propiônico por fermentação submersa utilizando glicerol e melão de cana como fontes de carbono**. Curitiba. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 2012.

HEBERT, P. D., CYWINSKA, A., BALL, S. L. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HORVÁTH, I. S., TABATABAEI, M., KARIMI, K., KUMAR, R. Recent updates on biogas production-a review. *Biofuel Research Journal*, v. 3, n. 2, p. 394-402, 2016.

HULSHOFF P. L. The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. Ph.D. Thesis Agricultural University Wageningen, The Netherlands. 1989. Disponível em: <http://edepot.wur.nl/202000> . Acesso em:03.05.2016.

HUNGATE, R. E. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in Microbiology*, New York, v. 3, p. 117-132, 1969.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. *Estudos avançados*, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

LAGO, A. C.; BONOMI, A.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; LIMA, M. A. P. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. *Biomass and Bioenergy*, v. 46, p. 5-12, 2012.

LEBONAH, D. E., DILEEP, A., CHANDRASEKHAR, K., SREEVANI, S., SREEDEVI, B., E PRAMODA K. J. DNA barcoding on bacteria: A Review. *Advances in Biology*, 2014.

LEIGH, J. A., ALBERS, S. V., ATOMI, H., ALLERS, T. Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. *FEMS microbiology reviews*, v. 35, n. 4, p. 577-608, 2011.

LIU, Y. Q.; MOY, B.; KONG, Y. H.; TAY, J. H. Formation, physical characteristics and microbial community structure of aerobic granules in a pilot-scale sequencing batch reactor for real wastewater treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 6, p. 520-525, 2010.

LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A. Toposeqüência de solos fertirrigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.7, n.3, p.525-532, 2003.

MADEJÓN, E.; LOPEZ, R.; MURILLO, J. M.; CABRERA, F. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 84, n.1, p.55-65, 2001.

MACHADO, C. R. **Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de exposição ao ar.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/90493/machado_cr_me_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y Acesso em: 12/04/2017.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. PARKER, J. **Brock biology of microorganisms.** 8a Ed. New Jersey: Prentice-Hall. p. 606-768. 1997.

MEDEIROS, Aline Weber. **Análise da comunidade bacteriana de animais marinhos recolhidos do litoral norte do Rio Grande do Sul**. Tese de Doutorado. UFRGS. Porto Alegre. p.2 . 2016. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/157895/000996014.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12/04/2017.

METCALF, Eddy; EDDY, M. Wastewater engineering: treatment and Resource recovery. **McGraw-Hill Education**, New York, 2014.

MISSAGIA, B. **Estudo das comunidades bacterianas em Filtros Biológicos Percoladores utilizados para o pós-tratamento de efluentes de um reator UASB**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <http://www.smarh.eng.ufmg.br/defesas/530D.PDF>. Acesso em: 03/05/2016.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 44, p. 888–903, 2015.

OLIVEIRA, P. A. V. Tecnologias para o manejo de resíduos na produção de suínos: Manual de boas práticas. Concórdia: Gestão Integrada de Ativos Ambientais, 2004. Cap. 4, p.42-55. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_n3r85f3h.pdf Acesso em: 05/05/2017.

POSSIGNOLO, N. V., ALVES, K. A. S., BARRETO, T. M., & VITTI, A. C. Caracterização da vinhaça in natura e concentrada para viabilização da mistura de fontes nitrogenadas. **Ciência & Inovação**, v. 2, n. 1, p. 29-38. 2015.

PAZINATO, J. M. **Isolamento e identificação de microrganismos metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental**. 188p. Tese (Doutorado) – Ecologia de Agroecossistemas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/CENA. Piracicaba (SP), 2007.

PETERSON, G.; ALLEN, C. R.; HOLLING, C. S. Ecological resilience, biodiversity, and scale. **Ecosystems**, v. 1, n. 1, p. 6-18, 1998. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs100219900002> Acesso em 14.04.2015.

PINTO, C. P. Tecnologia da Digestão Anaeróbica da Vinhaça e Desenvolvimento Sustentável, Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Mecânica, Unicamp, 1999.

PROSDOCIMI, F., COUTINHO, G., NINNECW, E., SILVA, A. F., REIS, A. N., MARTINS, A. C., CAMARGO F., F. Bioinformática: manual do usuário. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 12-25, 2002.

RAMANA, S.; BISWAS, A. K.; KUNDU, S.; SAHA, J. K.; YADAVA, R. B. R. Effect of distillery effluent on seed germination in some vegetable crops. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, p. 273-275, 2002.

RASI, Saija. **Biogas composition and upgrading to biomethane**. University of Jyväskylä, 79p. 2009. Disponível em: <https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/20353/9789513936181.pdf?sequence=1> Acesso em: 12.05.2017.

RIBEIRO, B. T., LIMA, J. M. D., GUILHERME, L. R. G., JULIÃO, L. G. F. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 4, p. 441-447, 2010.

RODRIGUES, A.; SANTOS, R. F.; AVACI, A. B.; ROSA, H. A.; CHAVES, L. I. ; GASPARIN, E. Estimativa do potencial de geração de energia elétrica a partir da vinhaça. **Acta Iguazu**, v. 1, n. 2, p. 80-93, 2012.

RODRÍGUEZ, J.F.; PÉREZ, M.; ROMERO, L. I. Comparison of mesophilic and thermophilic dry anaerobic digestion of OFMSW: kinetic analysis. **Chemical engineering journal**, v. 232, p. 59-64, 2013.

ROEST, K., HEILIG, H. G., SMIDT, H., DE VOS, W. M., STAMS, A. J., AKKERMANS, A. D..Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 175-185,2005.

ROTHSCHILD, L. J.; MANCINELLI, R. L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092-1101, 2001.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SATYAWALI Y. E., BALAKRISHANAN M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. **Journal of Environmental Management**, 86, p.481-497, 2008.

SAVOLAINEN, V., COWAN, R. S., VOGLER, A. P., RODERICK, G. K., LANE, R. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1805-1811, 2005.

APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Progress in energy and combustion science**, v. 34, n. 6, p. 755-781, 2008.

SCHMIEDER, R; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863-864, 2011.

SEIBEL, L. F. B.; LEMOS, M.; LIFSCHITZ, S. **Bancos de dados de genoma**. In: Procs. of the Brazilian Databases Symposium Tutorials. p. 514-553. 2000.

SHOKRALLA, S.; SPALL J. L.; GIBSON, J. F.; HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1794-1805, 2012.

SIDDALL, M. E., FONTANELLA, F. M., WATSON, S. C., KVIST, S., & ERSÉUS, C; Barcoding bamboozled by bacteria: convergence to metazoan mitochondrial primer targets by marine microbes, **Systematic Biology**, vol. 58, no. 4, pp. 445–451, 2009.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. O.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v11n1/v11n1a14.pdf>>. Acesso em 12.03.2016.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 4, n. 77, p.1153-1161, 2011.

SUWANNAKHAM, S. **Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici***. Tese de Doutorado. The Ohio State University, p. 258, 2005. Disponível em: https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=osu111728310&disposition=inline Acesso em: 14.03.2017.

TETRAPAN, ARCADIS. Estudo sobre o Potencial de Geração de Energia a partir de Resíduos de Saneamento (lixo, esgoto), visando incrementar o uso de biogás como fonte alternativa de energia renovável. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento – PNUD. Ministério do Meio Ambiente – MMA. v. 15, 2012. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/164/publicacao/164_publicacao10012011033201.pdf. Acesso em 25/05/2016.

THERON, J.; CLOETE, T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, 26, pp. 37-57.2000.

THRÄN, D. et al. Biomethane–status and factors affecting market development and trade. **Eds. M. Junginger, D. Baxter**, IEA Bioenergy, 2014.

ÚNICA. **União da Indústria da Cana-de-Açúcar**. São Paulo. Brasil. Disponível em: <http://www.unica.com.br/documentos/documentos/4aeec21a84a17ad345fd71e6959b5805> Acesso em: 01.10.2016.

VAVILIN, V. A.; FERNANDEZ, B.; PALATSI, J.; FLOTATS, X. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. **Waste management**, v. 28, n. 6, p. 939-951, 2008.

VAZOLLER, R.F. **Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995. 295 p.

VAZOLLER, R.F.; MANFIO, G.P., CANHOS, V.P. Diversidade no Domínio Archaea. In Canhos, V.P. and Vazoller, R.F. **Microrganismos & Virus**, v. 1. Série Biodiversidade do Estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do 112 século XX Org. by Joly, C.A. and Bicudo, C.E.M., Editora WinnerGraph & FAPESP, São Paulo, p. 118. 1999.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 345, n. 6270, p. 63, 1990.

WHEELIS, M. L.; KANDLER, O.; WOESE, C. R. On the nature of global classification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 7, p. 2930-2934, 1992.

ZANETTE, A. L. Potencial de aproveitamento energético do biogás no Brasil. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE. 97p. 2009. Disponível em: http://www.ppe.ufrj.br/pppe/production/tesis/zanette_luiz.pdf Acesso em: 17.03.2017.

ZEMPULSKI, D. A., VIAR, K. A. P., LAMPA, L. D. M., PETERNELA, J., CARDOSO, C., FIORESE, M. L., HASAN, S. D. M.. Produção De Ácidos Graxos Voláteis por Fermentação Anaeróbia de Manipueira e de Permeado de Soro de Queijo. **Engevista**, v. 16, n. 4, p. 431-447, 2014.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 2, p. 316-322, 1996.