



### IDENTIFICAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO POR PCR- DGGE, DE AMOSTRAS DE REATOR ANAERÓBIO ALIMENTADO COM VINHAÇA

### IDENTIFICATION OF THE MICROBIAL CONSORTIUM BY PCR-DGGE IN SAMPLES FROM AN ANAEROBIC REACTOR FED WITH VINASSE

Janaina Iltchenco<sup>1</sup>; Vanessa Peruzzo<sup>2</sup>; Lademir Luiz Beal<sup>3</sup>; Suelen Paesi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Diagnóstico Molecular. Email: jiltchen@hotmail.com.

<sup>2</sup> Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Tecnologias Ambientais. Email: [vanessa.eng@hotmail.com](mailto:vanessa.eng@hotmail.com)

<sup>3</sup> Universidade de Caxias do Sul, Laboratório de Tecnologias Ambientais. Email: llbeal@ucs.br

<sup>4</sup> Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Diagnóstico Molecular. Email: sopaesi@ucs.br

**RESUMO:** A vinhaça é um subproduto da produção de etanol, e possui em sua composição diversos nutrientes, como: K, Mg, Ca, P. A vinhaça pode causar prejuízos ambientais, se descartada de forma inadequada, como poluição de lençóis freáticos, desertificação do solo, entre outros. O uso da vinhaça para produção de biogás é uma maneira de reaproveitar esse resíduo. O biogás é um gás proveniente da digestão anaeróbia de microrganismos, e contém metano que pode ser utilizado como combustível veicular e geração de energia. A identificação da microbiota pode ser feita através de técnicas moleculares como extração de DNA, PCR e DGGE, sendo necessária para posterior otimização do processo. Este estudo tem como objetivo identificar consórcios microbianos que atuam na fermentação da vinhaça, em amostra inicial e final da melhor produção de biogás, por PCR/ DGGE. Nesse estudo foram utilizados vinhaça de cana de açúcar como substrato e lodo granular como inóculo, em 4 concentrações de substrato/biomassa (So/Xo): 0,5, 1,0, 1,5, 1,7, operado em reator de bancada com 5 L de meio de trabalho, pH entre 4-7, temperatura a 35°C. Verificou-se a melhor produção de metano na relação So/Xo 1,7 (872,02 mL CH<sub>4</sub>/h). A microbiota inicial e final da fermentação foi verificada através das bandas do gel de DGGE, havendo diferenças entre os microrganismos identificados nas amostras, sendo 4 microrganismos na amostra inicial e 11 na amostra final, pertencentes aos filos Firmicutes e Proteobacteria para bactérias e 2 bandas de arqueias para cada amostra, do gênero Methanotrix. sendo associados a digestão anaeróbia.

**Palavras-chave:** Vinhaça, biogás, consórcio microbiano, PCR/DGGE.



**ABSTRACT:** Vinasse is a by-product of ethanol production, and has several nutrients in its composition, such as: K, Mg, Ca, P. Vinasse can cause environmental damage, if improperly discarded, such as groundwater pollution, and soil desertification, among others. The use of vinasse for biogas production is a way to reuse this residue. Biogas is gas from the anaerobic digestion of microorganisms and contains methane that can be used as a vehicle fuel and power generation. Identification of the microbiota can be done through molecular techniques such as DNA extraction, PCR, and DGGE, being necessary for further process optimization. This study aims to identify microbial consortia that act in the vinasse fermentation, in the initial and final samples of better biogas production, by PCR/ DGGE. In this study, sugarcane vinasse used sugar as substrate and granular sludge as inoculum, in 4 concentrations of substrate/biomass (So/Xo): 0.5, 1.0, 1.5, 1.7, operated in a benchtop reactor with 5 L of the medium of work, pH between 4-7, the temperature at 35°C. The higher methane production was verified in the So/Xo ratio 1.7 (872.02 mL CH<sub>4</sub>/h). The initial and final fermentation microbiota was verified through the bands of the DGGE gel, with differences between the microorganisms identified in the samples, with 4 microorganisms in the initial sample and 11 in the final sample, belonging to the phyla Firmicutes and Proteobacteria for bacteria and 2 bands of archaea for each sample, of the genus Methanotrix. associated with anaerobic digestion.

**Keywords:** Vinasse, biogas, microbial consortium, PCR/DGGE.

## 1 Introdução

O Brasil é o maior produtor de etanol mundial, produzindo em torno de 33,14 bilhões de litros de etanol no ano de 2019 (CONAB, 2019). 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 co-produtos como a vinhaça, que é aspergida diretamente no solo como biofertilizante. Porém, esse resíduo possui elevada carga orgânica, coloração marrom escura, de baixo pH, alto teor de sais, sendo altamente poluente. A vinhaça pode ser utilizada para produção de biogás através da digestão anaeróbia. O biogás é uma alternativa sustentável para produção de energia, pois pode ser produzido a partir de resíduos. Diversos microrganismos consorciados presentes no lodo, atuam na conversão da vinhaça em biogás, contudo novos conhecimentos são requeridos para se conhecer os parâmetros e os



microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia. Assim, o presente estudo tem como objetivo identificar consórcios microbianos que atuam na fermentação da vinhaça, em amostra inicial e final da melhor produção de biogás, por PCR/ DGGE.

## 2 Métodos

### 2.1 Substrato e inóculo

A vinhaça utilizada como substrato foi cedida pela indústria de etanol Guarani (Unidade Industrial Andrade – Pitangueiras/SP). O lodo granular anaeróbio é proveniente de reator de estação de tratamento de efluentes da indústria de óleo vegetal (Esteio, RS, Brasil), e foi utilizado como inóculo. Ambos foram coletados em setembro de 2015, sendo mantidos em câmara fria a 4°C.

### 2.2 Descrição dos bioensaios

Os bioensaios 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<sup>-1</sup>) ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 mol.L<sup>-1</sup>). 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. Os bioensaios foram feitos em 4 diferentes concentrações de vinhaça (substrato)/ lodo (biomassa) So/Xo: 0,5, 1, 1,5 e 1,7. As amostras líquidas foram coletadas em diferentes tempos. O biogás foi mensurado através do deslocamento de base, periodicamente. Análises cromatográficas foram realizadas semanalmente, a fim de verificar a produção de metano.



### 2.3 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de 250µl de amostra de reatores em diferentes concentrações com o kit de extração *PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, E.U. A.)*, de acordo com as instruções do fabricante. Aliquotas 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 pb, 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.

A técnica da PCR foi utilizada para a amplificação do DNA extraído de todas as amostras com primers universais que amplificam a região V8 do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal (1055F/1392R) de Bacteria (FERRIS et al., 1996). Após o término da reação, foi realizada eletroforese com gel de agarose para visualização do amplificado. As amplificações do material genético foram realizadas com o kit *Phusion High-Fidelity™ PCR (Finnzymes)*, seguindo o protocolo do fabricante. Após o término da reação, foi realizada eletroforese com gel de agarose para visualização do amplificado.

### 2.4 Identificação por PCR/DGGE

Os produtos de amplificação por PCR com primers universais foram analisados através de eletroforese com gradiente de concentração de agente de desnaturação, utilizando o sistema *The Dcode™ Universal Mutation Detection System (BioRad)*, que separa iguais fragmentos de DNA pela concentração de guanina e citosina no fragmento amplificado. O gel foi corado com *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)* por 30 minutos e as bandas foram observadas em transluminador com luz UV. Após a obtenção do gel de DGGE, as principais bandas serão recortadas e colocadas separadamente em tubos com água ultrapura estéril durante 16 horas, a 4°C. Em seguida, foi realizado um novo PCR, utilizando os iniciadores previamente citados, porém sem GC clamp.

O produto do PCR foi purificado utilizando o *Kit Illustra GFX 96 PCR Purification (GE Healthcare)* e seguirá para o sequenciamento. As sequências nucleotídicas foram alinhadas e identificadas através do GenBank. A purificação das amostras foi realizada com enzimas EXO I (0,25µL), SAP (0,25µL), água ultra-pura autoclavada (0,5µL) e 6µL do produto de PCR; e após foram colocadas em termociclador a 37°C por 30 min e 80°C por 15 min, para retirar os primers. O sequenciamento das amostras foi realizado

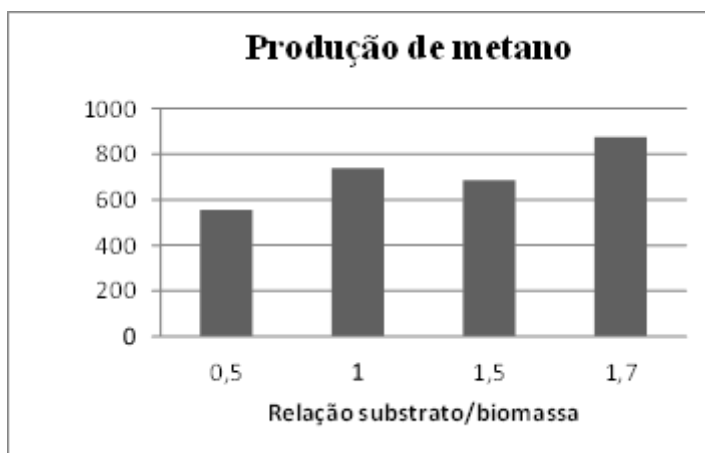
na ACTGENE - Serviço de Sequenciamento, utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*).

### 3 Resultados

#### 3.1 Produção de biogás

A digestão anaeróbia da vinhaça foi mais efetiva com maior disponibilidade de substrato (So/Xo:1,7), produzindo 872,02 mLCH<sub>4</sub>/h (Figura 01).

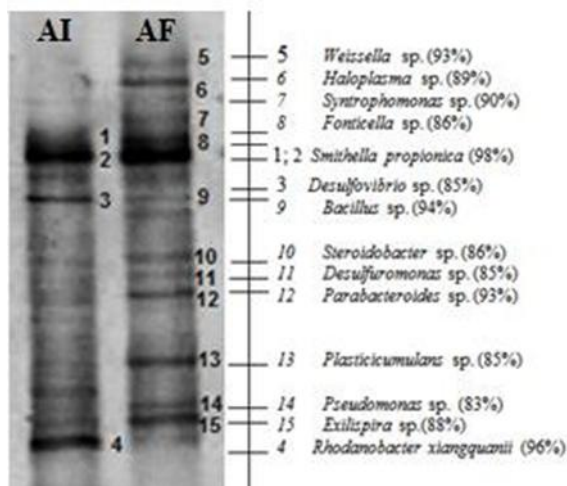
**Fig. 1:** Produção de metano em mL CH<sub>4</sub>/h, em diferentes concentrações de vinhaça/ inóculo.



#### 3.2 Análise de correlação

Com relação ao perfil das comunidades microbianas por DGGE das amostras inicial e final (Figura 2), a maioria das bandas presentes na mesma altura apresentou a mesma classificação e identificação taxonômica, então optou-se por apresentar as bandas de melhor qualidade e similaridade no sequenciamento. A análise do perfil das bandas para arqueias (Figura2-B), mostrou uma prevalência de 2 principais bandas para cada amostra. As bactérias correspondentes as bandas 1 a 9 pertencem ao filo Firmicutes; exceto 6 a Tenericutes; e 10 a 14 pertencem ao filo Proteobacteria.

**Fig. 2:** Perfil do gel de DGGE contendo fragmentos de DNAr 16S amplificados com primers universais para bactéria em amostra inicial (AI) e final (AF) do bioensaio So/Xo= 1,7.



Dai e colaboradores (2015) encontraram Firmicutes e Proteobacteria como predominantes em trabalho de co-digestão da vinhaça com resíduos animais. Firmicutes foi o filo predominante em amostras de reator UASB tratando vinhaça (Martinez et al., 2014). Esses microrganismos que pertencem ao filo Firmicutes são capazes de metabolizar carboidratos produtores de lactato, ácido succínico, ácido butírico, ácido valérico, ácido capróico, ácido acético e propiônico (MARCHADIN, 2010).

Bactérias do gênero *Rhodanobacter* foram isoladas a partir de lodo ativado de um sistema de tratamento de águas residuais na província de Jiangsu, China (ZHANG et al. 2011). Já *Syntrophomonas* é um dos gêneros mais comuns encontrados em estudos com digestão anaeróbia (HE et al., 2018). Bactérias do gênero *Desulfovibrio* e *Desulfuromonas* são redutoras de sulfato, e competem pelo alimento com as metanogênicas (BARTON and TOMEI, 1995; FINSTER et al., 1997).

A análise de agrupamentos separa as amostras em grupos que compartilham características semelhantes (perfis de conjuntos de bandas) a partir de uma matriz de similaridade que foi gerada da matriz de presença e ausência de bandas obtida nos géis de DGGE. O coeficiente de similaridade leva em consideração o número total de bandas apresentadas no DGGE e o número de bandas comuns presentes nas amostras.

A Figura 3 apresenta o dendograma gerado pelo software BioNumerics a partir dos perfis populacionais obtidos pela técnica de DGGE, indicando os coeficientes de similaridade entre os perfis.

**Fig. 3:** Dendograma baseado no perfil das bandas do gel de DGGE. Os valores nos pontos de ramificação do dendograma referem-se à similaridade, sendo relação So/Xo: 1,7 inicial (AI) e 1,7 final (AF).

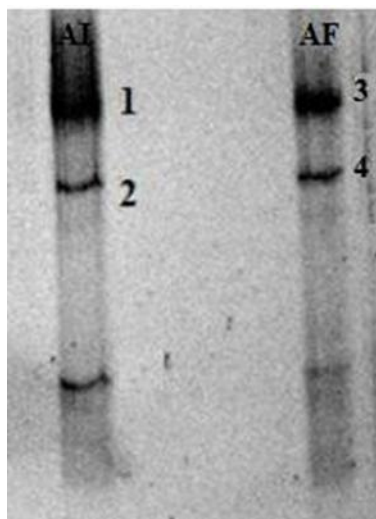


O dendograma demonstrou que a comunidade microbiana das amostras AI e AF encontra-se bem estabelecidas pela semelhança das bandas, e possuem 70,6% de similaridade.

### 3.3 Análise dos perfis de bandas de arqueias

A análise do perfil das bandas das amostras inicial e final para arqueias, mostrou uma prevalência de 2 principais bandas cada amostra, sendo que as amostras na mesma altura podem referir-se ao mesmo microrganismo. As bandas 1 e 3 de arqueias foram sequenciadas como *Methanotherix soehngeni*. Já as bandas 2 e 4 foram identificadas como sendo *Methanotherix sp.*

**Fig. 4:** Perfil do gel de DGGE com primers universais para arqueias (ARC 344F-915R/GC) em amostra inicial (AI) e final (AF) do bioensaio So/Xo= 1,7.

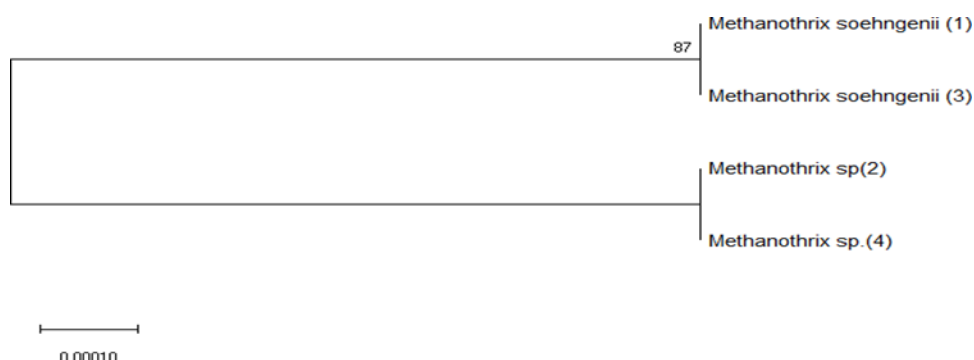


As arqueas do gênero *Methanotherix* são acetoclásticas, descarboxilam acetato, produzindo metano e dióxido de carbono (HUSER et al., 1982). Porém, a partir de 1990 o gênero *Methanotherix* recebeu a

nomenclatura Methanosaeta (PATEL & SPROTT, 1990; KAMAGATA et al., 1992; BOONE and KAMAGATA, 1998 ).

O dendograma do perfil de bandas de arqueas apresenta uma semelhança de 87% de similaridade (Figura 5).

**Fig. 5:** Dendograma baseado no perfil das bandas do gel de DGGE para arqueas. Os valores nos pontos de ramificação do dendograma referem-se à similaridade entre as bandas pertencentes a amostra inicial (1 e 2) e amostra final (3 e 4).



#### 4 Conclusões

A porção mais representativa da comunidade bacteriana presente no reator mesofílico operado com vinhaça e tendo como inóculo o lodo granular, diferiu entre amostras inicial e final em reator que apresentou melhor produção de metano. A técnica de PCR/DGGE permitiu observar através das bandas, o predomínio de microrganismos dos filos Firmicutes e Proteobacteria, que são comuns na digestão anaeróbia, corroborando com outros trabalhos. Com relação a identificação de arqueas, pode-se salientar a presença de Methanotherix (ou Methanosaeta) na biodigestão da vinhaça.

#### Referências

CONAB. (2019). Produção de etanol no Brasil mantém recorde com 33,14 bilhões de litros. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2859-producao-de-etanol-no-brasil-mantem-recorde-e-alcanca-33-58-bilhoes-de-litros> Acesso em: 29.12.2019.

Barton, L. L., & Tomei, F. A. (1995). Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. In: Sulfate-reducing bacteria. Springer, Boston, MA, p. 1-32.





Boone, D. R., & Kamagata, Y. (1998). Rejection of the species *Methanotherix soehngeni* VP and the genus *Methanotherix* VP as nomina confusa, and transfer of *Methanotherix thermophila* VP to the genus *Methanosaeta* VP as *Methanosaeta thermophila* comb. nov. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 1079-1080.

Dai, X., et al. (2015). Hygienic treatment and energy recovery of dead animals by high solid co-digestion with vinasse under mesophilic condition: feasibility study. *Journal of hazardous materials*, 297, 320-328.

Ferris, M. J., Muyzer, G., & Ward, D. M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 340-346.

Finster, K., et al. (1997). *Desulfuromonas thiophila* sp. nov., a new obligately sulfur-reducing bacterium from anoxic freshwater sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 754-758.

He, J., et al. (2018). Insights into biomethane production and microbial community succession during semi-continuous anaerobic digestion of waste cooking oil under different organic loading rates. *AMB Express*, 8(1), 92.

Huser, B. A., Wuhrmann, K., & Zehnder, A. J. (1982). *Methanotherix soehngeni* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Archives of Microbiology*, 132(1), 1-9.

Kamagata, Y., et al. (1992). Characterization of three thermophilic strains of *Methanotherix* ("Methanosaeta") *thermophila* sp. nov. and rejection of *Methanotherix* ("Methanosaeta") *thermoacetophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(3), 463-468.

Marchandin, H., Juvonen, R., & Haikara, A. (2010). In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 4, v-3 Firmicutes (2nd ed., p. 1082-1090). Baltimore, MD: Williams and Wilkins Co.

Patel, G. B., & Sprott, G. D. (1990). *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("Methanotherix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(1), 79-82.

Tan, H.-Q., et al. (2012). *Parabacteroides chartae* sp. nov., an obligately anaerobic species from wastewater of a paper mill. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(11), 2613-2617.

Zhang, J., et al. (2011). *Rhodanobacter xiangquanii* sp. nov., a novel anilofos-degrading bacterium isolated from a wastewater treating system. *Current Microbiology*, 62(2), 645-649.