



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

EDUARDO AUGUSTO FELIPE DE VASCONCELOS

**ESTUDOS ECOLÓGICOS DE COMUNIDADES MICROBIANAS TRATANDO
GLICEROL EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS PELA APLICAÇÃO DE BIOLOGIA
MOLECULAR**

FORTALEZA

2017

EDUARDO AUGUSTO FELIPE DE VASCONCELOS

ESTUDOS ECOLÓGICOS DE COMUNIDADES MICROBIANAS TRATANDO
GLICEROL EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS PELA APLICAÇÃO DE BIOLOGIA
MOLECULAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ecologia e Recursos Naturais. Área de concentração: Conservação e manejo de Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Sandra Tédde Santaella
Co-orientador: Dr. Renato Carrhá Leitão

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V45e Vasconcelos, Eduardo Augusto Felipe de.
Estudos ecológicos de comunidades microbianas tratando glicerol em condições anaeróbias pela aplicação de biologia molecular / Eduardo Augusto Felipe de Vasconcelos. – 2017.
113 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Sandra Tédde Santaella.
Coorientação: Prof. Dr. Renato Carrhá Leitão.
1. Ecologia microbiana. 2. Digestão anaeróbia. 3. Biorreatores. 4. Hidrogênio. 5. PCR-DGGE. I. Título.
CDD 577
-

EDUARDO AUGUSTO FELIPE DE VASCONCELOS

ESTUDOS ECOLÓGICOS DE COMUNIDADES MICROBIANAS TRATANDO
GLICEROL EM CONDIÇÕES ANAERÓBIAS PELA APLICAÇÃO DE BIOLOGIA
MOLECULAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ecologia e Recursos Naturais. Área de concentração: Conservação e manejo de Recursos Naturais.

Aprovado em 07/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Sandra Tédde Santaella

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Morsyleide de Freitas Rosa

Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (Embrapa)

Prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Oscarina Viana de Sousa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho à Deus, à minha família,
à minha noiva e meus amigos. Todos foram
fundamentais para o meu sucesso!

AGRADECIMENTOS

Todos nós somos responsáveis pelos caminhos que escolhemos trilhar. Mas nem todos suportamos a jornada escolhida. E se eu cheguei até este momento, foi porque tive muita ajuda e apoio, das mais variadas pessoas e instituições. Portanto, me sinto honrado de agradecer, com a devida justiça:

Às instituições:

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN), que me permitiram a chance de cursar o doutorado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em particular a unidade Embrapa Agroindústria Tropical, que disponibilizou estrutura física, laboratórios, pessoal e recursos, permitindo a execução de grande parte de meus experimentos. Agradeço também ao Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA - UFC), em particular ao Laboratório de Saneamento Ambiental (Labosan), bem como ao Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa. Todos estes foram locais onde executei minhas análises e aprimorei muito do que aprendi. Muito obrigado por ceder sua estrutura física e recursos para que minha tese pudesse ser concluída.

À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (Funcap), Projeto BMD 008/0008/00345.01.01/12, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Projeto 473352/2011-7, pelo apoio grande financeiro que esta pesquisa recebeu.

Aos pesquisadores, professores e funcionários:

Agradeço aos meus orientadores, profa. dra. Sandra Tédde Santaella e dr. Renato Carrhá Leitão, pela orientação ao longo destes anos. Por mais que tenhamos pontos de vista e abordagens diferentes, eu aprendi imensamente com vocês. Me tornei mais analítico e científico, com maior capacidade crítica, de escrita e de argumentação. As diversas publicações que pude fazer parte, tanto as já publicadas, quanto aquelas submetidas ou em andamento, eu sei que devo também ao que aprendi com vocês. Agradeço também pelos vários recursos, laboratórios, materiais, reagentes e análises que me disponibilizaram, que tornaram minha pesquisa possível. Obrigado!

Ao prof. dr. André Bezerra dos Santos, que me acolheu como um membro do Labosan, que me tirou dúvidas e me tantas vezes me cedeu seu laboratório e seus recursos! Sem estes muito do que aprendi de biologia molecular não teria sido possível, bem como o

próprio desenvolvimento do meu trabalho, que foi incrivelmente facilitado! Você tem grande parte no sucesso desta pesquisa, professor! Muito obrigado!

À dra. Patrícia do Nascimento Bordallo, que com muita paciência e compreensão, me acolheu como um membro do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa, que me ouviu quando eu tinha questionamentos, que me tirou tantas dúvidas e me deu tantos conselhos e sugestões excelentes! Além de tudo, me cedeu seu laboratório e seus recursos sempre que precisei. Você também foi crucial no meu processo de aprendizado e desenvolvimento em biologia molecular e no sucesso de minha pesquisa! Muito obrigado!

À Ana Cassales (LTB Embrapa), à Lilian Chain Alexandre (LTB Embrapa) e à Ancelita Rodrigues Monteiro (BioMol Embrapa), que tanto me ajudaram com minhas análises e com equipamentos, que tiveram paciência de me ensinar e, quando se fez necessário, “puxar minhas orelhas” quando eu mereci. Obrigado!

À coordenadora do PPGERN, profa. dra. Roberta Boscaini Zandavalli e à secretária do curso Milena Rodrigues, ambas que com (muita) paciência tiraram todas as minhas (inúmeras) dúvidas sobre o curso, sobre a tese, os manuscritos, a qualificação, a defesa etc, sempre me esclarecendo da melhor maneira possível. Obrigado! Ao Rondinelley Gomes, que tanto me ajudou em seu tempo na secretaria do PPGERN e que me deu preciosos conselhos dentro e fora do curso. Obrigado!

Aos drs. Elisa Rodriguez e Alexandre Colzi, que tanto me ensinaram tudo o que foi possível sobre biologia molecular, bem como me ensinaram a interpretar adequadamente os dados obtidos em DGGE e discutí-los de maneira crítica. Muito obrigado!

À Família, noiva e amigos:

Agradeço também aos meus pais (Eloneid Felipe Nobre e Dimas Augusto de Vasconcelos) pelo eterno e incondicional apoio em toda a minha vida acadêmica. Gostaria de agradecer em especial à minha mãe, Eloneid, que sempre foi um exemplo dessa perseverança no meio acadêmico e profissional, e que sempre me apoiou de uma forma incomparável durante todos estes anos. Muito obrigado! Agradeço aos meus irmãos, tanto os de sangue quanto os de coração (Talita, Raquel, Pedro, Gabriel, Átila e Jade), que tanto me ouviram reclamar do cansaço desse período inteiro, mas que sempre me apoiaram e também me serviram de exemplo de sucesso em suas respectivas áreas. Obrigado!

À minha noiva amada e futura esposa, Vanessa Bessa, que tanto me apoiou, que me ajudou a me manter de pé, que tanto ouviu minhas reclamações, medos e tensões, que se alegrou com minha alegria, se enfureceu com minha ira e se entristeceu com minha tristeza. Ela, que me conheceu no momento em que comecei o doutorado, que tanto esperou e

suportou, sempre com fé e amor, mesmo quando precisava me apontar meus erros de conduta ou de perseverança, que me ligava para me lembrar das refeições, que me ligava quando eu precisava acordar de madrugada para estudar, que me deu seu ombro amoroso quando eu precisava desabar. Meu amor, meu muito obrigado por tudo!!!

Aos meus grandes amigos e sábios conselheiros: Walewsky Oliveira, Rebeca Sousa, Francisco Filho, Davi Antunes, Sarah Carolina, Victor Martins, André Gomes, Ítalo Marinho, Stelamaris Paula, Sarah Alverne, Jean Carlos, Steffany Gadelha, Márcio Nascimento, Rubens Cândido, Hemerson Thiago e Álvaro Luis. Muito obrigado por sempre terem uma palavra amiga, pelo apoio constante e uma eterna e incansável “torcida organizada” por esse seu amigo! Obrigado pelos tantos anos de paciência e amizade! Dentre esses amigos, gostaria de ressaltar: Walewsky Oliveira e Rebeca Sousa, por tantas vezes me receberem com uma amizade imensa que superar a dos maiores e mais chegados irmãos! Seu apoio, paciência, amizade e dedicação comigo é algo raro e precioso! Ao Francisco Filho, que mesmo com seu jeito distraído, consegue ser um dos melhores amigos que esse doutorando metódico e perfeccionista que eu sou poderia ter, por mais que pareça contraditório! À Sarah Carolina, Jean Carlos, Steffany Gadelha e Márcio Nascimento, irmãos de fé, companheiros de jornada espiritual e fraternal, que tanto ganharam minha amizade, respeito e admiração ao longo dos últimos anos! Gostaria também de agradecer à minha colega e amiga Déborah Praciano, em nossas inúmeras conversas, tentando “sobreviver” ao doutorado, com apoio mútuo, como amigos e pesquisadores! Agora podemos finalmente dizer: Sobrevivemos! Somos doutores! Muito obrigado!

Aos amigos do Labosan:

Ao trio de ouro do Laboratório de Biologia Molecular, o famoso “grupo biomol” do Labosan: Gervina Brady, Patrícia Gadelha e Lívia Galdino, que tanto me ajudaram na biologia molecular, e que, com suas críticas construtivas e coerentes me ajudaram imensamente a amadurecer dentro e fora dos laboratórios. Vocês, que me acompanharam desde o começo nesta luta árdua e tanto me auxiliaram, me ensinaram e conversaram quando eu mais precisava, meu muito obrigado! Aos amigos do Labosan, que sempre me fizeram sentir em casa, em especial: Gilmar, Antônio, Luciane, Carol, Eduardo, David, Diego, Vivian, Amanda e João Paulo. Obrigado, pessoal! E à grande amiga Suelen Carneiro, que conheci pelo “trio biomol” do Labosan! Uma amiga que ganhei quase no fim da tese, mas que teve uma participação fundamental na conclusão desta etapa! Muito obrigado!

Aos meus amigos da Embrapa:

Aos membros (antigos e atuais) da equipe dos biorreatores, que convivemos juntos por esses anos e participaram deste processo de crescimento: Michael Viana, Quézia Maia, Socorro Vale, Camila Magalhães, Vanja Nunes, Rosemeri Dams, Tito Gehring, Alexsandro Viana, Willame Cavalcante, Beatriz Moura, Aldo Colares, Gleycielle Cavalcante, Alexandre Guilherme e Isabelle Baima. Muito obrigado, pessoal! Não posso esquecer o grande João Paulo Saraiva (grande Bubu), pesquisador da Embrapa e sempre um excelente parceiro de conversas, desde as mais técnicas até as mais nerds! Obrigado! Aos grandes colegas e amigos estagiários do LTB, com nossas mais variadas conversas, que quase sempre nos levavam aos risos, em especial: Halisson, Jade, Diego, Amanda, Jéssica, Celso, Edna, André, Elígenes, Vitória e Lindervan. Obrigado, pessoal!

A todos os demais amigos e colegas que não foram citados, mas que com sua compreensão e alegria me deram o apoio que eu mais precisava!

E, como o melhor fica para o final: agradeço de toda o meu coração à Deus, de quem me aproximei nos últimos anos, a quem eu tanto recorri, fosse na dor para pedir sabedoria e perseverança, fosse na alegria para agradecer suas bênçãos. Senhor, muito obrigado! Dedico este trabalho à Ti, que me deu forças e ânimo quando eu já achava que não teria como me manter de pé e que proporcionou pessoas incríveis para me ajudar, as quais se submeteram ao estresse e ao cansaço, mesmo nos momentos mais árduos, para que meu trabalho pudesse se concretizar.

“Se enxerguei mais longe, é porque pude me apoiar sobre os ombros de gigantes” (Isaac Newton, 1676)

RESUMO

Técnicas de biologia molecular aplicadas em digestão anaeróbia permitem estudar a ecologia microbiana e estrutura de comunidades em biorreatores. O glicerol é um subproduto da transesterificação e pode ser usado para produzir hidrogênio por digestão anaeróbia, portanto, conhecer as interações microbianas permite compreender a relação entre os fatores biológicos, operacionais e funcionais, aperfeiçoando os processos envolvidos e o desempenho do sistema. Esta pesquisa teve como objetivo estudar as variações de diversidade, riqueza e organização funcional da comunidade microbiana, relacionando os parâmetros ecológicos, operacionais, a funcionalidade e a produtividade de reatores anaeróbios. Reatores UASB hidrogênicos foram operados e monitorados, sob aumentos de COV. Os afluentes utilizados foram: glicerol residual e glicerol puro (duas fases), com solução de nutrientes em todos os afluentes. Analisou-se: DQO, metabólitos, pH, vazão, volume e composição de gás, organização funcional, riqueza, diversidade de Shannon, e espécies encontradas por sequenciamento de Sanger. Amostras do lodo foram coletadas e armazenadas a cada mudança de COV e o DNA foi extraído e amplificado com primers contendo grampos GC para os domínios *Bacteria* e *Archaea*, seguido por DGGE em gel de poliacrilamida (8%) para os dois domínios. As bandas resultantes foram excisadas, amplificadas, purificadas e sequenciadas. Os resultados mostraram que em cargas abaixo de 30 kg DQO/m³.d houve elevação da capacidade de suporte e estabilidade do meio, com baixa organização funcional e aumento da riqueza e diversidade em ambos os estudos, para ambos os domínios e substratos. Os parâmetros populacionais de *Bacteria* nos estágios seguintes reduziu e a organização funcional aumentou, indicando aumento gradual no nível de especialização da comunidade. Os aumentos populacionais foram maiores com glicerol residual do que com puro devido à especificidade do segundo substrato quando comparado ao residual, mais generalista. Os parâmetros ecológicos de *Archaea* nas etapas posteriores decaíram por inibição pelo substrato, o que promoveu aumento da produtividade do domínio *Bacteria*. O glicerol puro se mostrou um substrato pior para o desenvolvimento de metanogênicas do que o residual.

Palavras-Chave: Ecologia microbiana. Digestão anaeróbia. Biorreatores. Hidrogênio. PCR-DGGE.

ABSTRACT

Molecular biology techniques applied in anaerobic digestion allow the study of microbial ecology and community structure in bioreactors. Glycerol is a byproduct of transesterification and can be used to produce hydrogen by anaerobic digestion, so understanding the microbial interactions is necessary to assess the relation among biological, operational and functional factors, improving the processes and the performance of the system. This research aimed to study the variations of diversity, richness and functional organization of the microbial community, analyzing ecological and operational parameters, as well as the functionality and productivity of anaerobic reactors. Hydrogenic UASB reactors were operated and monitored under OLR increases. The feeding used were: crude glycerol and pure glycerol (two phases), with nutrient solution in all the influents. The parameters analyzed were: COD, metabolites, pH, flow, volume and gas composition, functional organization, range-weighted richness, Shannon diversity, and species found by Sanger sequencing. Sludge samples were collected and stored at each OLR change and the DNA was extracted and amplified with primers containing GC clamps for Bacteria and Archaea domains, followed by DGGE on polyacrylamide gel (8%) for both domains. The resulting bands were excised, amplified, purified and sequenced. The results showed that in OLR below $30 \text{ kg COD/m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ there was an increase in the carrying capacity and stability of the environment, with low functional organization and increased richness and diversity in both studies, for both domains and substrates. Population parameters of Bacteria in the following stages decreased and functional organization increased, indicating a gradual increase in the level of community specialization. Populational increases were greater with residual glycerol than with pure due to the specificity of the second substrate compared to the residual, a more generalist substrate. The ecological parameters of Archaea in the later stages decreased due to inhibition by substrate excess, which promoted an increase in the productivity of the bacterial domain. Pure glycerol proved to be a worse substrate for the development of methanogens than the residual.

Key words: Microbial ecology. Anaerobic digestion. Bioreactors. Hydrogen. PCR-DGGE.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	A origem do glicerol	16
1.2	Digestão anaeróbia de glicerol	17
1.3	Estudos ecológicos microbianos por meio de técnicas moleculares	18
1.4	Objetivos e organização da tese	20
2	FERMENTATIVE HYDROGEN PRODUCTION FROM RESIDUAL GLYCEROL: A REVIEW	22
2.1	Introduction	22
2.2	Biochemistry of the anaerobic digestion of glycerol	23
2.3	Factors affecting hydrogen production from glycerol	25
2.3.1	<i>Type of reactor</i>	25
2.3.2	<i>Inocula and pre-treatments</i>	25
2.3.3	<i>Initial substrate to microorganisms ratio (S0/X0)</i>	27
2.3.4	<i>Temperature</i>	28
2.3.5	<i>pH</i>	29
2.3.6	<i>Buffer</i>	30
2.3.7	<i>Microbial diversity in anaerobic hydrogenogenic reactors</i>	30
2.4	Final discussion	33
2.5	Acknowledgements	34
3	FACTORS THAT AFFECT BACTERIAL ECOLOGY IN HYDROGEN-PRODUCING ANAEROBIC REACTORS	35
3.1	Introduction	35
3.2	Interactions between hydrogen- and non-hydrogen-producing microorganisms	36
3.3	Bacterial diversity and stability in anaerobic hydrogenogenic reactors	38
3.4	Molecular techniques for the characterization of mixed cultures in hydrogen reactors	41
3.5	Operational parameters that affect community structure in hydrogenogenic reactor	42
3.5.1	<i>OLR, pH and temperature</i>	44
3.5.2	<i>Inocula</i>	46
3.5.3	<i>Pre-treatments</i>	47

3.5.4	<i>Carbon source</i>	48
3.5	Bacterial ecology and system functioning of hydrogen reactors	49
3.6	Conclusion	51
3.7	Acknowledgements	52
4	MICROBIAL ECOLOGY AND COMMUNITY STRUCTURE IN AN UASB REACTOR FED WITH RESIDUAL GLYCEROL	53
4.1	Introduction	53
4.2	Materials and Methods	54
4.2.1	<i>Substrate and inoculum</i>	54
4.2.2	<i>Bioreactor set-up</i>	54
4.2.3	<i>Operation strategy</i>	55
4.2.4	<i>DNA extraction and PCR amplification of the 16S rRNA</i>	55
4.2.5	<i>Denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE)</i>	56
4.2.6	<i>Statistical analysis</i>	57
4.2.7	<i>Sequencing and phylogenetic analysis</i>	57
4.3	Results and discussion	58
4.3.1	<i>Hydrogen production and yield</i>	58
4.3.2	<i>Microbial community characterization</i>	63
4.3.3	<i>Microbial community identification</i>	66
4.4	Conclusions	71
4.5	Acknowledgements	71
5	MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS OF ACIDOGENIC UASB REACTORS TREATING GLYCEROL UNDER INCREASING ORGANIC LOADING RATES	73
5.1	Introduction	73
5.2	Materials and Methods	74
5.2.1	<i>Bioreactors set up</i>	74
5.2.2	<i>Substrate and inoculation</i>	75
5.2.3	<i>Operation strategy</i>	76
5.2.4	<i>DNA extraction and amplification of the 16S rRNA</i>	76
5.2.5	<i>Denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE)</i>	77
5.2.6	<i>Statistical analysis</i>	77
5.2.7	<i>Sequencing and phylogenetic analysis</i>	78
5.3	Results and discussion	78

5.3.1	<i>Operational results</i>	78
5.3.1.1	<i>Phase I - Hydrogen production</i>	80
5.3.1.2	<i>Phase II - Hydrogen production</i>	80
5.3.1.3	<i>Hydrogen yields</i>	81
5.3.1.3	<i>Fermentation products</i>	82
5.3.2	<i>Microbial ecology</i>	84
5.3.3	<i>Microbial community structure and identification</i>	87
5.4	Conclusions	93
5.5	Acknowledgements	94
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
	REFERÊNCIAS	97