UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

DÉBORA FARIA FONSECA

**DIVERSIDADE MICROBIANA ASSOCIADA AO USO DE SULFETO COMO
DOADOR DE ELÉTRONS PARA A REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE
EFLUENTES DE REATORES ANAERÓBIOS APLICADOS AO
TRATAMENTO DE ESGOTOS SANITÁRIOS**

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos – SP
2012

**DIVERSIDADE MICROBIANA ASSOCIADA AO USO DE SULFETO COMO
DOADOR DE ELÉTRONS PARA A REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE
EFLUENTES DE REATORES ANAERÓBIOS APLICADOS AO
TRATAMENTO DE ESGOTOS SANITÁRIOS**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos, da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Doutor em Ciências,
Programa de Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Tit. Eugênio Foresti

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos – SP
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Atendimento ao Usuário do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

F676d	<p>Fonseca, Débora Faria</p> <p>Diversidade microbiana associada ao uso de sulfeto como doador de elétrons para a remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios aplicados ao tratamento de esgotos sanitários. / Débora Faria Fonseca ; orientador Eugenio Foresti. São Carlos, 2012.</p> <p>Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2012.</p> <p>1. Nitrato. 2. Sulfeto. 3. Desnitrificação. 4. Águas residuárias. 5. PCR/DGGE. I. Título.</p>
-------	--

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel e Licenciada **DÉBORA FARIA FONSECA**.

Título da tese: "Diversidade microbiana associada ao uso de sulfeto como doador de elétrons para a remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios aplicados ao tratamento de esgotos sanitários".

Data da defesa: 10/08/2012

Comissão Julgadora:

Prof. Titular **Eugenio Foresti (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof^a. Dr^a. **Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof^a. Dr^a. **Cláudia Etchehebere Arenas**
(Universidade de La Republica/Uruguai)

Prof^a. Dr^a. **Valéria Maia de Oliveira**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Prof^a. Dr^a. **Juliana Calábria de Araújo**
(Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG)

Resultado:

Aprovada

Aprovada

Aprovada

Aprovada

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Titular **Edson Cezar Wendland**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

A meus pais, Olair Fonseca e Maria Izabel de Faria Fonseca, pelo exemplo de união, dedicação, doação de si, paciência e pelo imensurável amor, fonte e origem de todo o bem em minha vida.

Aos meus nove irmãos: Sara, Raquel, Filipe, Pedro, Paulo, André, Tiago, João Marcos e Mirian, que são muitos, mas incrivelmente singulares no modo como enriquecem a minha história e a de nossa família.

Ao Danilo Carvalho Adair, por personificar a coragem, a força e a garra como dons divinos, essenciais às pequenas e grandes vitórias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom maravilhoso e inestimável da vida.

Aos meus pais, Olair Fonseca e Maria Izabel de Faria Fonseca, meus exemplos de generosidade, bondade, dedicação, comprometimento e amor. Aos meus irmãos: Sara, Raquel, Filipe, Pedro, Paulo, André, Tiago, João Marcos e Mirian, razão da minha alegria e orgulho, por compartilharmos nossas histórias e por construirmos juntos as pessoas melhores que almejamos ser, pelo exercício da humildade, da compreensão, da paciência e do amor que a nossa convivência nos proporciona.

A todos os meus familiares, aos meus padrinhos de batismo, João Batista e Cleuza Sérgio e à minha madrinha de crisma, Andréa Huber, por todo o apoio e presença em todas as etapas da minha vida.

Ao querido Danilo Carvalho Adair, meu grande amigo desde a infância, sempre presente, sempre um presente. Deus foi muito generoso comigo ao me conceder ainda a honra e o privilégio de tê-lo ao meu lado para viver a dávida do amor junto dele.

Ao estimado Professor Eugenio Foresti, pela confiança que depositou em mim desde que nos conhecemos e, principalmente, pelo entusiasmo com que vive a Ciência e com que transmite sua profunda experiência.

Ao Professor Marcelo Zaiat, com quem tive o privilégio da convivência enriquecedora, pela valiosa amizade e pela grande competência profissional e pessoal.

À Professora Ruth de Gouvêa Duarte, pela amizade incondicional, por todos os ensinamentos e principalmente por fazer-me parte de sua família.

À Professora Maria Bernadete A. Varesche Silva, por toda a estrutura oferecida, pela oportunidade dos estágios de Capacitação Docente e por todas as sugestões durante o decorrer deste trabalho.

A todos os docentes do Departamento de Hidráulica e Saneamento e, em especial, aos Professores Luís Daniel, Marcius Giorgetti e Edson Wendland.

À Dr. Eloisa Pozzi, por sua alegria, disponibilidade e por todo o auxílio com as análises de microbiologia e biologia molecular.

À Dr. Márcia H. R. Damianovic, pela amizade espontânea e por suas palavras sempre otimistas e belas, além de todo o profissionalismo e competência.

Ao Professor Juan Lema Rodicio, da Universidade de Santiago de Compostela, pela hospitalidade e generosidade. A toda a sua equipe e, especialmente, à Dr. Mónica Figueroa Leiro, pela imensa disponibilidade e atenção com que me acompanhou durante todo o estágio.

Ao amigo e competente profissional Theo Syrto Octavio de Souza, por todos os ensinamentos, por sua postura irrepreensível e por ter confiado a mim as análises microbiológicas e biomoleculares de seus sistemas de reatores.

À querida amiga Bruna de Souza Moraes e aos grandes amigos Gustavo Mockaitis, Guilherme Peixoto e Jorge L. R. Pantoja Filho, pelos convites para os trabalhos em parceria, pelo companheirismo e pela convivência de altíssimo nível.

Aos queridos amigos Ludimila Turetta, Paulo Vagner dos Santos, Regiane Correa, Eduardo Penteado, Livia Botta e Mariana Carosia, cuja presença fez e sempre fará toda a diferença em meus dias.

A todos os amigos dos tempos de faculdade. Em especial, à Mariana Benassi, Kelly Pereira, Flávia Gomes, Rodrigo Camilo e Géssia Momoe Shida.

À amiga de todos e quaisquer tempos Gianni Marcon.

Aos muitos amigos e irmãos na fé, espalhados pelo mundo e pelo nosso País, dos quais muito recebi: alegrias, presenças, palavras edificadoras e de ânimo, orações.

Em especial, a todos das Paróquias São Benedito (São Carlos, SP) e Nossa Senhora do Rosário (São João da Boa Vista, SP).

A todos os companheiros de jornada: Pilar Anzola, Priscila Camiloti, Raquel Rossi, Tiago Palladino, Sandra Maintinguer, José Alberto Leite (Betão), Flavia Talarico Saia, Djalma Ferraz Tiago Martins, Rafael Brito, Daniele Vich e às Professoras Renata Rodriguez, Ana Cláudia Barana, Deize Lopes, Adis Brown, Adriana Braga, Carolina Lazaro, Dagoberto Okada, Daniel Fontes, Fabiana Mestrinelli, Fabrício Moterani, Juliana Kawanishi, Lorena Oliveira, Lucas Marcon, Mara Rúbia Lima, Regiane Ratti e Vinícius Rocha.

Aos alunos de Iniciação Científica do LPB e, em especial, ao Bruno Garcia e Gabriel Magdalon, para os quais compartilho a responsabilidade e a honra de auxiliar em suas formações como pesquisadores.

Aos técnicos e funcionários do LPB e SHS: Isabel Sakamoto, Maria Ângela Adorno, Sr. Edson Corneta, Fernando Moura, Silvana, Juliana Custódio, D. Angela, Sr. Antonio, Sr. Carlos, Derli, Camilo e D. Irene, Maria Auxiliadora C. A. Pin (Sá), Pavlovna Bueno (Pavi), Rose Jesus, Fernanda, Flávia G. Canova e André C. Garcia.

A todas as pessoas que contribuíram para que esta vitória fosse alcançada e que não estão aqui nomeadas. Acredito que todo o bem realizado retorna àquele que o praticou.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas e pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

À Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) e à Universidade de São Paulo (USP), centros de excelência em ensino, pesquisa e extensão, por toda a estrutura

proporcionada ao desenvolvimento e difusão da Ciência. Especialmente, à Pós-Reitoria de Pós-Graduação e à Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Hidráulica e Saneamento, pelo financiamento do estágio em Santiago de Compostela e participação nos congressos em Londres e Amsterdam.

À cidade de São Carlos, que ofereceu a oportunidade não apenas para o meu crescimento profissional, mas me acolheu também como cidadã e como pessoa.

*“A leitura não é suficiente sem a compunção,
o conhecimento sem a devoção,
a investigação sem o arrebatamento do enlevo,
a prudência sem a capacidade de abandonar-se à alegria,
a atividade separada da religiosidade,
o saber separado da caridade,
a inteligência sem a humildade,
o estudo sem o suporte da graça divina,
a reflexão sem a sabedoria inspirada por Deus.”*

*(Itinerarium mentis in Deum, São Boaventura. In:
Fides et ratio, Ioannes Paulus PP. II, 1998)*

RESUMO

FONSECA, D. F. **Diversidade microbiana associada ao uso de sulfeto como doador de elétrons para a remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios aplicados ao tratamento de esgotos sanitários.** 2012. 167 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A ampla ocorrência de contaminação de águas por compostos de nitrogênio em concentrações superiores às recomendadas pela legislação tem suscitado interesse no desenvolvimento de tecnologias viáveis de remoção desses compostos. A remoção biológica de nitrogênio apresenta como principais vantagens os custos relativamente reduzidos e a possibilidade de maior eficiência. Compostos reduzidos de enxofre como sulfetos podem ser oxidados a enxofre elementar ou a sulfato por bactérias oxidantes de sulfeto que utilizam nitrato ou nitrito como receptor de elétrons. Esta desnitrificação reduz os requerimentos globais de carbono para a remoção de nutrientes, com menor produção de lodo, proporcionando grande economia. O objetivo desta pesquisa consistiu em contribuir para o conhecimento acerca dos aspectos microbiológicos do processo de desnitrificação com o uso de sulfeto. Foram avaliados os efeitos dos modos de operação dos reatores desnitrificantes sobre a biomassa em cada uma das diferentes configurações e monitorada a colonização microbiana por meio de técnicas de Biologia Molecular como PCR/DGGE, sequenciamento e análises filogenéticas. Os fragmentos do gene RNAr 16S foram relacionados aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Clostridium*, *Cupriavidus* e *Ralstonia*. Filotipos dos clones para o sistema piloto foram associados a bactérias não cultiváveis e *Firmicutes* envolvidos na digestão anaeróbia em reatores tratando água residuária, *Synergistetes*, *Deferribacteria* e *Proteobacteria*. Foram identificados micro-organismos presentes nos reatores com reconhecida capacidade para desnitrificação: *Pseudomonas*, *Desulfovibrio desulfuricans* e *Ralstonia*. Amostras de ambos os reatores desnitrificantes apresentaram reações de amplificação positivas com *primers* específicos para bactérias semelhantes a *Thiomicrospira* associados a *primers* universais: 100% das amostras amplificaram com OST1F/1492R e 75% com EUB8F/OSTR1R. Para duas condições de operação do reator em escala de bancada foram identificados micro-organismos semelhantes a *Sulfurimonas denitrificans*, bactéria autotrófica redutora de nitrato e oxidadora de sulfeto. *Chloroflexi* também foram encontrados em digestores localizados em plantas de tratamento de águas residuárias recebendo essencialmente efluente doméstico e *Propionibacterium* foi associada a comunidade microbiana de reatores UASB tratando água residuária industrial. Bactérias em associações sintróficas com participação no ciclo do enxofre e/ou na digestão anaeróbia foram igualmente identificadas: *Clostridium sulfidigenes* e outros *Firmicutes*, *Synergistetes*, clones de bactérias de cultura de enriquecimento e bactérias do gênero *Syntrophorhabdus*. Os resultados deste trabalho proporcionaram associar a colonização microbiana com o desempenho e as características metabólicas de alguns micro-organismos com reatores desnitrificantes combinados para o tratamento de águas residuárias.

Palavras-chave: Remoção biológica de nitrogênio. Sulfeto. Desnitrificação. Águas residuárias. PCR/DGGE.

ABSTRACT

FONSECA, D. F. **Microbial diversity associated with the use of sulfide as electron donor for nitrogen removal from wastewater of reactors applied to anaerobic treatment of sewage.** 2012. 167 f. Tesis (PhD) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The widespread nitrate contamination in concentrations higher than recommended by legislation has raised interest in technologies for water and wastewater treatment. Biological nitrogen removal is relatively low cost and higher efficiency. Sulfide as electron donor can be oxidized to elemental sulfur or sulfate by sulfide oxidizing bacteria that can use nitrate or nitrite as electron acceptor. This type of denitrification reduces the overall requirements for removal of carbon nutrients and less sludge is produced. The aim of this research was to contribute to microbiological knowledge about denitrification using sulfide. The effects of operation conditions on the denitrifying biomass were monitored through molecular biology techniques such as PCR/DGGE, sequencing and phylogenetic analysis. 16S rRNA gene fragments were related to *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Clostridium*, *Cupriavidus* and *Ralstonia*. Phylotypes of clones from samples of pilot-scale reactor were associated with non-cultivable bacteria and *Firmicutes* involved in anaerobic digestion of wastewater, *Synergistetes*, *Deferribacteria* and *Proteobacteria*. Microorganisms with ability to denitrification were identified in both reactors: *Pseudomonas*, *Desulfovibrio desulfuricans* and *Ralstonia*. Samples of denitrifying reactors showed positive amplification with specific primers for *Thiomicrospira* associated to universal primers: 100% of the samples amplified with OST1F/1492R and 75% EUB8F/OSTR1R. *Sulfurimonas denitrificans*-like were identified for two operational conditions of the bench scale reactor. *Chloroflexi* were also found in treatment plants digesters receiving domestic wastewater and *Propionibacterium* was associated with microbial community of UASB reactors treating industrial wastewater. Syntrophic bacteria participating in the sulfur cycle and/or anaerobic digestion were also identified: *Clostridium sulfidigenes* and other *Firmicutes*, *Synergistetes*, clone enrichment culture bacteria and *Syntrophorhabdus*. These results provide to associate this microbial colonization and metabolic characteristics of some microorganisms with performance of combined denitrifying reactors for treatment of wastewater.

Keywords: Biological nitrogen removal. Sulfide. Denitrification. Wastewater. PCR/DGGE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Ciclo biogeoquímico parcial do nitrogênio, conduzido por micro-organismos. Os numerais romanos indicam o estado de oxidação formal das principais espécies de nitrogênio do ciclo. (Fonte: modificado e adaptado de Zumft, 1997).....39

Figura 2.2 – Interação e competição entre nitrificantes aeróbios e anaeróbios. Uma interface aeróbio-anaeróbia que existe na superfície de um sedimento ou biofilme ou na interface de um corpo de água estratificado. As interações entre três nitrificantes são consideradas. O amônio é liberado pela degradação anaeróbia de matéria orgânica e difunde-se para a interface aeróbia. O oxigênio é proveniente da fotossíntese. Tanto as bactérias *anammox* (oxidação anaeróbia de amônio) quanto as oxidadoras de nitrito são dependentes de nitrito (NO_2^-) que é gerado pelas oxidadoras aeróbias de amônia. Bactérias *anammox* competem com dois grupos de aeróbias por amônia e nitrito, respectivamente, enquanto que as oxidadoras de amônio competem com as *anammox* por amônio e com as oxidadoras de nitrito por oxigênio (KUENEN, 2008). Photosynthesis: fotossíntese; aerobic NH_4^+ oxidizers: oxidadores aeróbios de NH_4^+ ; aerobic NO_2^- oxidizers: oxidadores aeróbias de NO_2^- ; anaerobic mineralization of dead organic matter: mineralização anaeróbia de matéria orgânica morta; organotrophic NO_2^- and NO_3^- reduction with formate, acetate and propionate by anammox bacteria: redução organotrófica de NO_2^- e NO_3^- com formiato, acetato e propionato por bactérias *anammox*; interface: interface; aerobic: aeróbia; anaerobic: anaeróbia. (Fonte: reproduzido de Kuenen, 2008).....41

Figura 2.3 – Transformações desassimilativas de compostos nitrogenados. (Fonte: modificado de Kartal et al., 2007).....44

Figura 2.4 – Organização modular do processo de desnitrificação. Quatro módulos representam os sistemas de respiração utilizando nitrato (a), nitrito (b), NO (c) e N_2O (d) constituem o processo global. A desnitrificação completa (h) é alcançada apenas quando os quatro módulos são ativados. As sobreposições (e a g) dos módulos de respiração individuais ocorrem naturalmente em desnitrificantes e em outras bactérias redutoras de óxidos de nitrogênio. Designações para os genes: nar, respiração de nitrato; nir, respiração de nitrito; nor, respiração de óxido nítrico; nos: respiração de óxido nitroso (Fonte: ZUMFT, 1997).....45

Figura 2.5 – Relações filogenéticas de espécies-tipo de desnitrificantes autotróficos baseadas no gene RNAr 16S. Neighbor-joining, Jukes-Cantor-corrected DNA distances. Valores de distâncias de bootstrap (>60%) estão indicados em cada ramo. (Fonte: Shao et al., 2010).....53

Figura 2.6 – Transformações envolvendo compostos de enxofre. SH: sulfidril; chemolithotrophic oxidation: oxidação quimiolitotrófica; oxic: óxico; sulphate assimilation: assimilação de sulfato; SH groups of proteins: proteínas contendo grupos sulfidril; desulphurylation: dessulfurilação; SO_4^{2-} reduction: redução de sulfato; anoxic: anóxico; sulphur disproportionation: dismutação de enxofre; S_0 reduction: redução de enxofre elementar; phototrophic and chemolithotrophic oxidation: oxidação fototrófica e quimiolitotrófica. (Figura reproduzida de Muyzer; Stams, 2008).....55

Figura 4.1 – Ensaios microbiológicos e biomoleculares a que foram submetidas as amostras coletadas do reator desnitrificante R3 em escala de bancada e do reator anaeróbio/anóxico em escala piloto, nas diferentes condições de alimentação.....70

Figura 4.2 – Esquema geral do sistema de reatores em escala de bancada para tratamento de esgoto sanitário sintético: (1) esgoto sanitário sintético; (2) bomba para alimentação de R1; (3) reator UASB para digestão anaeróbia (R1); (4) esgoto doméstico pré-tratado anaerobiamente; (5) bomba para alimentação de R2; (6) reator nitrificante (R2); (7) compressor de ar; (8) efluente nitrificado; (9) mistura dos efluentes dos reatores R1 e R2; (10) bomba para alimentação de R3; (11) reator UASB para desnitrificação (R3); (12) bomba de recirculação; (13) efluente final. As amostras para os ensaios microbiológicos e biomoleculares deste estudo foram coletadas do reator R3, no ponto indicado pelo retângulo. (Fonte: Souza, 2011).....72

Figura 4.3 – Esquema geral do sistema de reatores em escala piloto para tratamento de esgoto sanitário real. RA: reator principal, compartimentado e de fluxo ascendente; RB: reator aeróbio, de fluxo ascendente, para promover a nitrificação de parcela da vazão efluente do compartimento inferior de RA bombeada para RB; (1) bomba para alimentação de RA; (2) câmara inferior de RA, destinada à digestão anaeróbia do esgoto sanitário afluente; (3) câmara intermediária de RA; (4) câmara superior de RA, destinada à desnitrificação; (5) separação do biogás; (6) bomba para alimentação de RB; (7) difusor de ar; (8) compressor de ar; (9) câmara nitrificante de RB. Foram coletadas as amostras para ensaios microbiológicos e biomoleculares do presente estudo a partir de (2) e (4). As medidas estão em centímetros. (Fonte: Souza, 2011).....81

Figura 4.4 – *Primers* OST1F e OST1R altamente específicos combinados com dois *primers* universais, 27F e R1492R, que foram usados para gerar sequências quase completas do gene RNAr 16S por meio de PCR específica (HÖFLE et al., 2005) para DNA extraído de todas amostras do reator desnitrificante em escala de bancada e piloto. (Fonte: Höfle et al., 2005).....89

Figura 4.5 – Mapa do vetor *pGEM-T Easy Vector*. Modificado de Promega (2005).....95

Figura 5.1 – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40 - 60%) dos fragmentos do gene RNAr 16S amplificados por PCR utilizando *primers* para o Domínio *Bacteria*. Amostras de biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada alimentado com 40% de efluente nitrificado e 60% de efluente não nitrificado: amostra 13 (condição C4), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e de 18 mg S²⁻.L⁻¹; amostra 14 (condição C5), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e sem adição de S²⁻; amostra 15 (condição C7), sem adição de NaHCO₃ e com adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹. As bandas identificadas pelos retângulos representam aquelas para as quais as reações de sequenciamento foram bem sucedidas.....109

Figura 5.2 – Análise densitométrica dos perfis de bandas do gel de DGGE para as amostras coletadas do reator desnitrificante em escala de bancada nas condições operacionais C4, C5 e C7. (a) Identificação das bandas no gel de gradiente desnaturante e dendograma associado. (b) Dendograma e sua respectiva matriz de similaridade. Os padrões de bandas do gel de DGGE foram comparados pelo coeficiente de similaridade

Dice. A matriz de similaridade resultante foi convertida em dendograma por meio do algoritmo de *clustering* UPGMA e a correlação entre as similaridades derivadas do dendograma e a matriz de similaridade foi calculada pelo método *Cophenetic Correlation*.....110

Figura 5.3 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 13a do reator desnitrificante em escala de bancada R3 e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.....112

Figura 5.4 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 14a do reator desnitrificante em escala piloto e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.....114

Figura 5.5 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 14e do reator desnitrificante em escala de bancada R3 e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.....114

Figura 5.6 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 15b do reator desnitrificante em escala de bancada R3 e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.....116

Figura 5.7 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 15c do reator desnitrificante em escala de bancada R3 e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.....117

Figura 5.8 – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40 - 60%) dos fragmentos do gene RNAr 16S amplificados por PCR utilizando *primers* para o Domínio Bacteria a partir de amostras do reator desnitrificante em escala piloto. As amostras 7 e 8 correspondem à biomassa coletada das câmaras anaeróbia e desnitrificante, respectivamente, do reator alimentado com efluente não nitrificado (Condição C1). As amostras 17 e 18 correspondem à biomassa retirada da câmara desnitrificante e anaeróbia do reator, respectivamente, ao término da Condição C2 (alimentação com 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado). As amostras 19 e 20 referem-se à da câmara desnitrificante e anaeróbia do reator ao término da Condição C3, em que foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%). As amostras 21 e 22 referem-se ao enriquecimento de cultura desnitrificante a partir das amostras 19 e 20. As bandas identificadas pelos retângulos representam aquelas para as quais as reações de sequenciamento foram bem sucedidas.....119

Figura 5.9 – Análise densitométrica dos perfis de bandas do gel de DGGE para as amostras coletadas do reator desnitrificante em escala piloto nas condições operacionais C1, C2 e C3. (a) Identificação das bandas no gel de gradiente desnaturante e dendograma associado. (b) Dendograma e sua respectiva matriz de similaridade. Os padrões de bandas do gel de DGGE foram comparados pelo coeficiente de similaridade *Dice*. A matriz de similaridade resultante foi convertida em dendograma por meio do algoritmo de *clustering* UPGMA e a correlação entre as similaridades derivadas do dendograma e a matriz de similaridade foi calculada pelo método *Cophenetic Correlation*.....120

Figura 5.10 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 7c do reator desnitrificante em escala piloto e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.....123

Figura 5.11 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 7c do reator desnitrificante em escala piloto e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.....124

Figura 5.12 – Alinhamentos entre a sequência obtida da amostra 17b do reator desnitrificante em escala piloto e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.....126

Figura 5.13 – Gel de agarose 1,4% para separação dos produtos obtidos a partir de PCR específicas pela aplicação do *primer* específico OST1F e do *primer* universal 1492R, segundo Höfle et al. (2005), para todas as amostras de DNA provenientes dos reatores desnitrificantes em escala de bancada (amostras 13, 14, 15) e piloto (amostras 16, 17, 18, 19 e 20). Amostras de biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada alimentado com 40% de efluente nitrificado e 60% de efluente não nitrificado: amostra 13 (condição C4), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e de 18 mg S²⁻.L⁻¹; amostra 14 (condição C5), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e sem adição de S²⁻; amostras 15 (condição C7), sem adição de NaHCO₃ e com adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹. A amostra 16 corresponde à biomassa do reator desnitrificante em escala piloto alimentado com efluente não nitrificado (condição C1); a amostra 17 corresponde à biomassa do reator ao término da operação C2 (alimentação com 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado); as amostras 18, 19 e 20 referem-se à Condição C3, em que o reator desnitrificante foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%). Pd: padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (de 100 a 2000 pb, Invitrogen).....129

Figura 5.14 – Gel de agarose 1,4% para separação dos produtos obtidos a partir de PCR específicas pela aplicação do *primer* universal EUB 8F e do *primer* específico OST1R, segundo Höfle et al. (2005), para todas as amostras de DNA provenientes dos reatores desnitrificantes em escala de bancada (amostras 13, 14, 15) e piloto (amostras 16, 17, 18, 19 e 20). Amostras de biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada alimentado com 40% de efluente nitrificado e 60% de efluente não nitrificado: amostra 13 (condição C4), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e de 18 mg S²⁻.L⁻¹; amostra 14 (condição C5), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e sem adição de S²⁻; amostras 15 (condição C7), sem adição de NaHCO₃ e com adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹. A amostra 16 corresponde à biomassa do reator desnitrificante em escala piloto alimentado com efluente não nitrificado (condição C1); a amostra 17 corresponde à biomassa do reator ao término da operação C2 (alimentação com 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado); as amostras 18, 19 e 20 referem-se à Condição C3, em que o reator desnitrificante foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%). Pd: padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (de 100 a 2000 pb, Invitrogen).....130

Figura 5.15 – Gel de agarose 1,4% para separação dos produtos obtidos a partir de PCR específicas pela aplicação do *primer* específico S-De-F e do *primer* universal 1392R, segundo Zhang et al. (2009), para todas as amostras de DNA provenientes dos reatores desnitrificantes em escala de bancada (amostras 13, 14, 15) e piloto (amostras 16, 17,

18, 19 e 20). Amostras de biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada alimentado com 40% de efluente nitrificado e 60% de efluente não nitrificado: amostra 13 (condição C4), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e de 18 mg S²⁻.L⁻¹; amostra 14 (condição C5), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e sem adição de S²⁻; amostras 15 (condição C7), sem adição de NaHCO₃ e com adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹. A amostra 16 corresponde à biomassa do reator desnitrificante em escala piloto alimentado com efluente não nitrificado (condição C1); a amostra 17 corresponde à biomassa do reator ao término da operação C2 (alimentação com 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado); as amostras 18, 19 e 20 referem-se à Condição C3, em que o reator desnitrificante foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%). Pd: padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (de 100 a 2000 pb, Invitrogen).....131

Figura 5.16 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificação dos produtos de PCR com *primers* 27F/1100R da amostra 19 (a, b: em duplicata), proveniente da condição C3 de operação do reator desnitrificante em escala piloto, para clonagem de fragmentos do gene RNAr 16S. Pd: padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (de 100 a 2000 pb, Invitrogen).....132

Figura 5.17 – Géis de agarose 0,8% para verificação dos produtos de PCR com os *primers* M13 para amplificação dos plasmídeos (a, b, c). Pd: padrão de massa molecular *High Mass* 100, 50, 25 ng/μL; tamanhos: 3000, 1000 e 250 pb.....133

Figura 5.18 – Distribuição de filotipos para os clones obtidos para a amostra 19 da câmara anaeróbia do reator desnitrificante em escala piloto na condição de operação C3.....137

Figura 5.19 – Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos de fragmentos do gene RNAr 16S do Domínio *Bacteria*, revelando a relação entre os clones obtidos para a amostra 19 (Condição C3, reator desnitrificante em escala piloto). O padrão de ramificação foi gerado a partir do método de *Neighbor-joining* e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1000 árvores. A filogenia bacteriana foi reconstruída a partir de sequências parciais do gene RNAr 16S pelo método estatístico *Neighbor-joining*, utilizando o modelo de substituição *Maximum Composite Likelihood*. Os ramos terminais estão identificados por gênero ou espécie e com o número de acesso do *GenBank* da respectiva sequência. Os números nos ramos indicam os valores de *bootstrap*. A barra indica o número estimado de modificações por posição de nucleotídeo na sequência.....140

Figura 5.20 – Imagem de microscopia óptica de amostra da primeira coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 30 dias do início de sua operação (aumento: 1000 vezes).....142

Figura 5.21 – Imagem de microscopia óptica de amostra da segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 60 dias do início de sua operação (aumento: 1000 vezes).....143

Figura 5.22 – Imagem de microscopia óptica de amostra da segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 60 dias do início de sua operação (aumento: 1000 vezes).....144

Figura 5.23 – Imagem de microscopia óptica de alíquota retirada de um dos frascos da quintuplicata da diluição – 5 do ensaio de NMP para desnitrificantes autotróficos incubado a partir de amostra da segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 60 dias do início de sua operação (aumento: 1000 vezes).....145

Figura 5.24 – NMP de bactérias desnitrificantes heterotróficas (amostragens 1 e 2) e desnitrificantes autotróficas (amostragem 3) em 100 mL da cultura realizadas a partir de lodo do reator desnitrificante em escala piloto ao término das condições C1 e C2.....146

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades físicas de compostos inorgânicos de nitrogênio. Valores termodinâmicos: ° refere-se a condições padrão (pH 0, 25°C) e °' corresponde às condições fisiológicas (pH 7, 25°C). (Fonte: adaptado de Jetten et al., 2009).....	35
Tabela 2.2 – Enzimas do ciclo do nitrogênio e reações por elas catalisadas. As reações são mostradas como reações redox parciais em que a enzima age como principal receptor ou doador de elétrons. (Fonte: adaptado de Jetten et al., 2009).....	37
Tabela 2.3 – Metabolismo quimioautotrófico. Doadores e receptores de elétrons na assimilação de CO ₂ a partir de reações exergônicas de oxidação de compostos inorgânicos. (Fonte: adaptado de material didático gentilmente cedido pelo Prof. J. M. Alfons Stams).....	43
Tabela 2.4 – Elementos metabólicos-chave dos genomas completos sequenciados de desnitrificantes autotróficos. (Fonte: adaptado de Shao et al., 2010).....	49
Tabela 2.5 – Gêneros e espécies de alguns exemplos de micro-organismos desnitrificantes, agrupados de acordo com o modo de crescimento ou outra característica fisiológica predominante.....	51
Tabela 4.1 – Características do reator contínuo em escala de bancada R1 (SOUZA, 2011).....	74
Tabela 4.2 – Composição do esgoto sanitário sintético para o reator R1 (SOUZA, 2011).....	74
Tabela 4.3 – Características do reator contínuo em escala de bancada R2 (SOUZA, 2011).....	76
Tabela 4.4 – Composição do meio sintético para nitrificação utilizado (Souza, 2011, adaptado de Iamamoto, 2006).....	77
Tabela 4.5 – Características do reator contínuo em escala de bancada R3 (SOUZA, 2011).....	78
Tabela 4.6 – Condições estudadas neste trabalho para o reator R3 (SOUZA, 2011).....	79
Tabela 4.7 – Condições estudadas para o reator desnitrificante em escala piloto.....	82
Tabela 4.8 – Conjunto de todos os <i>primers</i> utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para esta pesquisa.....	86
Tabela 4.9 – Caracterização de temperaturas e períodos utilizados em termociclador para as reações de amplificação de sequências parciais do gene RNAr 16S com os <i>primers</i> universais 968F e 1392R.....	88

Tabela 4.10 – Caracterização de temperaturas e períodos utilizados nas reações de amplificação utilizando os <i>primers</i> OST1F e OST1R altamente específicos combinados com os <i>primers</i> universais 27F e R1492R em termociclador.....	89
Tabela 4.11 – Caracterização de temperaturas e períodos utilizados em termociclador para as reações de amplificação utilizando os <i>primers</i> S-De-F/1392R para <i>S. denitrificans</i> ou T-De-F/T-De-R para <i>T. denitrificans</i>	90
Tabela 4.12 – Reagentes e respectivas quantidades para reação de adenilação de produtos de PCR purificados.....	94
Tabela 4.13 – Reagentes e respectivas quantidades para reações de ligação de inserto de DNA ao vetor.....	96
Tabela 4.14 – Reagentes e respectivas concentrações para a preparação de Meio LB ágar acrescido de X-Gal, IPTG e ampicilina para semeadura de células transformadas com vetor.....	97
Tabela 4.15 – Condições para as reações de sequenciamento em termociclador....	99
Tabela 4.16 – Composição da água fosfatada para a diluição do inóculo no ensaio de quantificação de bactérias desnitrificantes heterotróficas.....	102
Tabela 4.17 – Composição do Meio CSB modificado.....	104
Tabela 5.1 – Sequências parciais de genes RNAr 16S obtidas a partir das bandas excisadas do gel de DGGE de amostras do reator desnitrificante em escala de bancada, amplificadas com <i>primers</i> para o Domínio <i>Bacteria</i> , comparadas com sequências depositadas na base de dados do <i>GenBank</i>	111
Tabela 5.2 – Sequências parciais de genes RNAr 16S obtidas a partir das bandas excisadas do gel de DGGE de amostras do reator desnitrificante em escala piloto, amplificadas com <i>primers</i> para o Domínio <i>Bacteria</i> , comparadas com sequências depositadas na base de dados do <i>GenBank</i>	122
Tabela 5.3 – Identidade das sequências obtidas por clonagem de fragmentos do gene RNAr 16S bacteriano por comparação com a base de dados do <i>GenBank</i>	135
Tabela 5.4 – Resumo dos microrganismos detectados nos dois sistemas de reatores por meio de métodos biomoleculares.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B1	Bomba de alimentação de RA no sistema piloto
B2	Bomba de alimentação de RB no sistema piloto
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNAr	DNA ribossômico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
NMP	Número Mais Provável
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
R1	Reator em escala de bancada para digestão anaeróbia
R2	Reator nitrificante em escala de bancada
R3	Reator desnitrificante em escala de bancada
RA	Reator compartimentado anaeróbio – anóxico em escala piloto
RB	Reator nitrificante em escala piloto
RAALF	Reator aeróbio – anaeróbio de leito fixo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAr	RNA ribossomal
SHS	Departamento de Hidráulica e Saneamento
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis

TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	Radiação ultravioleta
VFA	<i>Volatile fatty acids</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
cm	centímetros
G	grama
h	hora
L ⁽¹⁾	litro
L ⁽²⁾	unidade de volume
m	metro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mV	milivolt
µm	micrômetro
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	35
2.1 Ciclo Biogeoquímico do Nitrogênio e Desnitrificação	35
2.2 Populações microbianas associadas ao processo de desnitrificação	50
2.3 Ciclo Biogeoquímico do Enxofre e doadores de elétrons para a Desnitrificação Autotrófica	54
2.4 Sistemas aeróbio-anaeróbio combinados para tratamento de águas residuárias	58
2.5 Imobilização de biomassa em reatores	59
2.6 Investigação de populações microbianas por meio de Técnicas de Biologia Molecular	60
3 OBJETIVOS	67
4 MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1 Planejamento dos Ensaios	69
4.2 Reatores (SOUZA, 2011).....	71
4.2.1 Sistema de reatores contínuos em escala de bancada (SOUZA, 2011).....	71
4.2.1.1 Reator anaeróbio para remoção de matéria orgânica R1 (SOUZA, 2011).....	73
4.2.1.2 Reator aeróbio para nitrificação R2 (SOUZA, 2011).....	75
4.2.1.3 Reator anóxico para desnitrificação R3 (SOUZA, 2011).....	77
4.3 Sistemas de reatores em escala piloto (SOUZA, 2011)	79
4.4 Caracterização da biomassa enriquecida nos reatores.....	82
4.5 Diversidade morfológica das comunidades microbianas encontradas	83
4.6 Estudo da diversidade bacteriana dos reatores	84
4.6.1 Extração de DNA genômico	84
4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	85
4.6.3 Eletroforese em gel de agarose.....	90
4.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)	90
4.6.5 Clonagem de fragmentos do gene RNAr 16S	93
4.6.6 Reação de Sequenciamento e obtenção das sequências parciais.....	98
4.6.7 Análise das sequências parciais do gene RNAr 16S	99
4.7 Quantificação das populações desnitrificantes dos reatores por NMP.....	100
4.7.1 Estimativa de bactérias desnitrificantes heterotróficas pela técnica do Número Mais Provável (NMP)	101
4.7.2 Estimativa de bactérias desnitrificantes autotróficas pela técnica do Número Mais Provável (NMP)	103
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
5.1 Diversidade Bacteriana dos Reatores Desnitrificantes em Escalas de Bancada e Piloto	107
5.1.1 Comunidade bacteriana estabelecida no reator desnitrificante R3 em escala de bancada	108
5.1.2 Comunidade bacteriana estabelecida no reator desnitrificante em escala piloto.....	118

5.1.3 Clonagem de fragmentos do gene RNAr 16S bacteriano a partir de amostra do reator desnitrificante em escala piloto.....	131
5.2 Diversidade Morfológica das Comunidades Microbianas encontradas nos Reatores Desnitrificantes em Escalas Piloto e de Bancada.....	142
5.3 Caracterização da Biomassa Desnitrificante no Reator em Escala Piloto.....	145
6 CONCLUSÕES.....	149
7 SUGESTÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	151
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

1 INTRODUÇÃO

Compostos inorgânicos de nitrogênio, tais como nitrogênio amoniacal, nitratos e nitritos, são contaminantes comuns de corpos de água e podem ser tóxicos para organismos e causar depleção de oxigênio e eutrofização em corpos hídricos. Segundo Fernández et al. (2007), a remoção de nitrogênio é fundamental para evitar problemas de saúde pública e impactos ambientais. Os sulfetos ($S^{2-}/HS^-/H_2S$) são igualmente considerados como um problema ambiental, devido à sua toxicidade, odor, propriedades corrosivas e demanda química de oxigênio (DQO) (WANG; CHAPMAN, 1999).

O nitrogênio amoniacal (amônia, $N - NH_3$, ou íon amônio, $N - NH_4^+$), segundo Canto et al. (2008), pode ser removido eficientemente em estágios que utilizam as reações biológicas do ciclo do nitrogênio, sob condições físico-químicas e ambientais adequadas. Esses estágios podem atingir elevadas eficiências de remoção de nutrientes e matéria orgânica.

Sob a perspectiva de controle ambiental e sustentabilidade, foram intensificadas novas propostas de soluções biotecnológicas para o tratamento e remoção de nutrientes de águas residuárias.

Micro-organismos desnitrificantes são comumente encontrados em muitos ambientes naturais como solo, sedimentos marinhos e de água doce, bem como em sistemas de tratamento de águas residuárias. Bactérias desnitrificantes são geralmente heterotróficas e utilizam matéria orgânica como doador de elétrons. Algumas são capazes de realizar desnitrificação quimiolitotrófica, utilizando compostos inorgânicos para a redução de nitrato: compostos oriundos de processos anaeróbios como ácidos orgânicos, metano, álcoois, compostos reduzidos de enxofre (FORESTI et al., 2006) e carbono inorgânico (CO_2^- ou HCO_3^-) para a síntese celular microbiana.

O tratamento de águas residuárias contendo compostos orgânicos complexos e nitrogenados, por meio de processos combinados anaeróbio-aeróbio, requer baixo custo operacional, menor área para implantação da estação de tratamento e tem elevada eficiência como principais vantagens.

A desnitrificação utilizando compostos reduzidos de enxofre oferece grande potencial biotecnológico. O processo proporciona a remoção simultânea de nitrogênio e enxofre em um sistema de fase única e transforma tais contaminantes em formas ambientalmente aceitáveis (nitrogênio gasoso e sulfato ou enxofre elementar). Esse tipo de desnitrificação tem sido estudado, por exemplo, para o tratamento de água potável e águas subterrâneas (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1997; SIERRA-ALVAREZ et al., 2007), remoção simultânea de nitrogênio e enxofre de efluentes de indústrias petroquímicas (CARDOSO et al., 2006), remoção de nitrogênio de águas residuárias (KLEEREBEZEM; MENDEZ, 2002; KOENIG et al., 2005; FORESTI et al., 2006) e de sedimentos subsuperficiais (GREEN et al., 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ciclo Biogeoquímico do Nitrogênio e Desnitrificação

O nitrogênio (N) é um elemento do grupo 5B, com estados de oxidação entre -3 e +5 (Tabela 2.1). Em cada estado de oxidação, o átomo de nitrogênio combina-se com átomos de hidrogênio, oxigênio ou outros átomos de nitrogênio. Deste modo, existe ao menos uma única molécula inorgânica por estado de oxidação. Apesar de algumas dessas moléculas serem termodinamicamente mais estáveis que outras, todos os estados de oxidação são possíveis em sistemas aquosos, porque o estado de oxidação do N em um dado ambiente é controlado pela cinética (a energia de ativação de compostos nitrogenados é elevada) e não por equilíbrio termodinâmico. A maior parte do nitrogênio neste globo está presente sob a forma sólida, nas rochas. Entretanto, o gás dinitrogênio na atmosfera (79% vol.) é a mais importante fonte de nitrogênio disponível para os processos biológicos (JETTEN et al., 2009).

Tabela 2.1 – Propriedades físicas de compostos inorgânicos de nitrogênio. Valores termodinâmicos: ° refere-se a condições padrão (pH 0, 25°C) e °' corresponde às condições fisiológicas (pH 7, 25°C). (Fonte: adaptado de Jetten et al., 2009).

Composto	Fórmula	Estado de oxidação	ΔH_f° (kJ mol ⁻¹)	ΔG_f° (kJ mol ⁻¹)	S° (J mol ⁻¹ K)	pK
Amônio	NH ₄ ⁺	-3	133,1	-79,4	713	9,2
Hidrazina	N ₂ H ₄ (aq)	-2	34,4	128,5	-316	6,1
Hidroxilamina	NH ₂ OH (aq)	-1	-98,7	-22,9	-254	6,0
Gás dinitrogênio	N ₂ (g)	0	0	0	0	-
Óxido nitroso	N ₂ O (g)	+1	82,4	104,6	-74	-
Óxido nítrico	NO (g)	+2	90,6	86,9	12	-
Nitrito	NO ₂ ⁻	+3	-105,0	-37,4	-227	3,3
Dióxido de nitrogênio	NO ₂ (g)	+4	33,3	51,5	-61	-*
Nitrato	NO ₃ ⁻	+5	-208,2	-111,7	-324	-1,5

* Dióxido nítrico reage em água para nitrito e nitrato.

A fórmula química aproximada para um organismo vivo é $\text{CH}_2\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,15}$. Do ponto de vista microbiológico, a ciclagem de compostos nitrogenados na biosfera (o ciclo do nitrogênio) é constituído por cinco processos catabólicos (nitritificação, nitrificação, desnitrificação, redução desassimilatória de nitrato e *anammox*), três processos anabólicos (assimilação de amônio, redução assimilatória de nitrato e fixação de nitrogênio) e amonificação (resultado necessário da cadeia alimentar biológica). As enzimas mais importantes do ciclo do nitrogênio e as reações que catalizam estão sumarizadas na Tabela 2.2 (JETTEN et al., 2009)

Segundo Jetten (2008), as duas últimas décadas, a partir de 1996, mostraram que nosso conhecimento sobre os aspectos microbiológicos do ciclo do nitrogênio e seus principais agentes está longe de estar completo. Descobertas espetaculares como a oxidação anaeróbia de amônio (JETTEN et al., 1998; STROUS et al., 1999), a oxidação de amônia por *Crenarchaea* (AOA) (KOENNECKE et al., 2005), a interação entre esses dois grupos (LAM et al., 2007), a redução de nitrato a gás dinitrogênio por foraminíferos (RISGAARD-PETERSEN et al., 2006), de fototróficos oxidadores de nitrito (GRIFFIN et al., 2007), a oxidação anaeróbia de metano nitrito-dependente (N-DAMO) (RAGHOEBARSING et al., 2006; ETTWIG et al., 2008), de *archaea* hipertermofílicas fixadoras de nitrogênio produtoras de metano (MEHTA; BAROSS, 2006) e o sequenciamento do genoma de diversos organismos do ciclo do nitrogênio (CHAIN et al., 2003; STARKENBURG et al., 2006; ARP et al., 2007; STEIN et al., 2007) ilustram exemplos de que existe uma enorme biodiversidade e capacidade metabólica de conversões de nitrogênio escondidas no mundo microbiano, da qual conhecemos apenas pequena parte até o presente (JETTEN, 2008).

Tabela 2.2 – Enzimas do ciclo do nitrogênio e reações por elas catalisadas. As reações são mostradas como reações redox parciais em que a enzima age como principal receptor ou doador de elétrons. (Fonte: adaptado de Jetten et al., 2009).

Processo/enzima	Reação	E0' (V/e-)	Localização
<i>Nitrificação</i>			
Amônia mono-oxigenase	$\text{NH}_4^+ + \text{O}_2 + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$	0,73	Transmembrana
Hidroxilamina oxidoreductase	$\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_2^- + 5\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	-0,06	Periplasma
<i>Nitrificação/anammox</i>			
Nitrito oxidoreductase	$\text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	-0,43	Associada à membrana
Hidrazina hidrolase	$\text{NH}_4^+ + \text{NO} + 2\text{H}^+ + 3\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{H}_4 + \text{H}_2\text{O}$	0,34	Anammoxossomo
Hidrazina oxidoreductase	$\text{N}_2\text{H}_4 \rightarrow \text{N}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	-0,75	Anammoxossomo
<i>Desnitrificação e redução desassimilatória de nitrato</i>			
Nitrato redutase	$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	0,43	Associada à membrana, periplasma ou transmembrana
Nitrito redutase	$\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	0,34	Periplasma
Óxido nítrico redutase	$2\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	1,17	Transmembrana
Óxido nitroso redutase	$\text{N}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	1,36	Periplasma
Nitrito redutase desassimilatória	$\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	0,75	*

* descrita com atividade redutora tanto exteriormente quanto interiormente à membrana citoplasmática.

Além disso, novas tecnologias de sequenciamento e o refinamento de métodos moleculares revelaram quantos mistérios ainda estão escondidos na maioria da vasta diversidade funcional microbiana no ambiente (YOOSEPH et al., 2007).

Por outro lado, o aumento da queima de combustíveis fósseis e a alta demanda por nitrogênio na agricultura e na indústria indicam que a humanidade continua a transformar o ciclo global do nitrogênio a elevadas taxas (GALLOWAY et al., 2008). Grandes quantidades de nitrogênio antropogênico são perdidas para o ambiente e causam uma cascata de problemas, tais como o aumento dos níveis de nitrato em águas doces e da produção de óxido nítrico, que pode provocar o aumento das mudanças climáticas globais (DUCE et al., 2008).

O nitrogênio é removido da biosfera por meio da fixação biológica e química do dinitrogênio (N_2) introduzido novamente por meio dos processos de desnitrificação e de oxidação aneróbia de amônia (*anammox*). A desnitrificação catalisa a formação de sucessivas ligações nitrogênio – oxigênio, na transformação de seus intermediários óxido nítrico (NO) e óxido nítrico (N_2O) para estados de oxidação menores. O processo bacteriano tem, quase exclusivamente, caráter facultativo. Sua expressão é desencadeada na célula a partir dos parâmetros ambientais de baixa tensão de oxigênio e disponibilidade de um óxido de nitrogênio (ZUMFT, 1997).

O processo de desnitrificação diz respeito à redução desassimilativa de nitrato ou nitrito a N_2 , com concomitante conservação de energia (KNOWLES, 1982). Constitui um dos principais componentes do ciclo global do nitrogênio, juntamente com a fixação do nitrogênio, nitrificação e amonificação. A Figura 2.1 ilustra a parte desse ciclo que expressa os aspectos da química redox inerentes às principais espécies de nitrogênio inorgânico: dinitrogênio, amônia e nitrato.

Figura 2.1 – Ciclo biogeoquímico parcial do nitrogênio, conduzido por micro-organismos. Os numerais romanos indicam o estado de oxidação formal das principais espécies de nitrogênio do ciclo. (Fonte: modificado e adaptado de Zumft, 1997).

A fixação de dinitrogênio depende da reação da nitrogenase, que ocorre sem intermediários livres. Segundo Zumft (1997), a desnitrificação compreende quatro etapas enzimáticas, gerando os intermediários: óxido nítrico, nitritos e óxido nitroso. O único segmento oxidativo do ciclo é a nitrificação, conversão de amônia a nitrato via hidroxilamina (NH_2OH), catalisada por membros do gênero *Nitrosomonas*. O nitrito é oxidado a nitrato por *Nitrobacter* spp. A assimilação de nitrato e a amonificação envolvem o nitrito como único intermediário livre. Em geral, a incorporação de amônia em biomoléculas contendo nitrogênio inicia-se com a reação da glutamina sintetase.

A desnitrificação é parte do aparato bioenergético da célula bacteriana; oxianions de nitrogênio (nitrato e nitrito) e seus óxidos gasosos (NO e N_2O) são utilizados em lugar de oxigênio molecular (O_2) como receptores finais para o transporte de elétrons na fosforilação. O papel fundamental da desnitrificação no ciclo global do nitrogênio e na bioenergética celular justifica a necessidade de um conhecimento detalhado deste processo, de acordo com Zumft (1997).

Desde que o ciclo biológico do nitrogênio foi elaborado ao final do século XIX, a possibilidade da oxidação anaeróbia de amônio (*anammox*) foi geralmente negligenciada. Uma descoberta fortuita há apenas dezesseis anos atrás, em 1996, conduziu à identificação das bactérias quimiolitotróficas responsáveis por esse processo e a apreciação de sua aplicação e significado ecológico (STROUS; JETTEN, 2004). Atualmente, estima-se que o processo *anammox* contribua com mais de 50% para a remoção de nitrogênio dos oceanos, em termos globais (ARRIGO, 2005).

O habitat de bactérias *anammox* requer a presença simultânea de amônio e nitrito, que podem ser encontrados na interface aeróbio-anaeróbia de sedimentos e corpos de água ou próximo a ela. O amônio é produzido pela degradação anaeróbia de matéria orgânica, tanto por amonificação quanto por redução desassimilatória de nitrato e/ou nitrito. O nitrito é originado a partir da redução do nitrato que, por sua vez, deve-se tanto a organismos desnitrificantes comuns (litoautotróficos ou organoheterotróficos) ou da redução de nitrato por bactérias *anammox* na presença de compostos orgânicos como formiato, acetato ou propionato. Quando o amônio difunde-se ascensionalmente e encontra o oxigênio que está difundindo-se para baixo, o nitrito também pode ser derivado da nitrificação por bactérias aeróbias ou por oxidadoras de amônio (KUENEN, 2008).

Na interface aeróbia-anaeróbia (por exemplo, em um biofilme, em sedimentos ou em corpos de água estratificados), interações e competição podem ocorrer entre bactérias anaeróbias *anammox* e bactérias aeróbias oxidadoras de amônio e de nitrito – as oxidadoras de nitrito aeróbias competem com as oxidadoras de amônio aeróbias pelo oxigênio; as bactérias *anammox* competem com as oxidadoras de amônio e de nitrito, respectivamente, por amônio e nitrito (HAO et al., 2002). As bactérias *anammox* e as oxidadoras de nitrito aeróbias nessa interface necessitam das bactérias oxidadoras de

amônio anaeróbias para a produção de um de seus substratos – o nitrito (KUENEN, 2008). A Figura 2.2 ilustra os mecanismos acima descritos.

Figura 2.2 – Interação e competição entre nitrificantes aeróbios e anaeróbios. Uma interface aeróbia-anaeróbia que existe na superfície de um sedimento ou biofilme ou na interface de um corpo de água estratificado. As interações entre três nitrificantes são consideradas. O amônio é liberado pela degradação anaeróbia de matéria orgânica e difunde-se para a interface aeróbia. O oxigênio é proveniente da fotossíntese. Tanto as bactérias *anammox* (oxidação anaeróbia de amônio) quanto as oxidadoras de nitrito são dependentes de nitrito (NO_2^-) que é gerado pelas oxidadoras aeróbias de amônia. Bactérias *anammox* competem com dois grupos de aeróbias por amônia e nitrito, respectivamente, enquanto que as oxidadoras de amônio competem com as *anammox* por amônio e com as oxidadoras de nitrito por oxigênio (KUENEN, 2008). *Photosynthesis*: fotossíntese; *aerobic NH_4^+ oxidizers*: oxidadores aeróbios de NH_4^+ ; *aerobic NO_2^- oxidizers*: oxidadores aeróbios de NO_2^- ; *anaerobic mineralization of dead organic matter*: mineralização anaeróbia de matéria orgânica morta; *organotrophic NO_2^- and NO_3^- reduction with formate, acetate and propionate by anammox bacteria*: redução organotrófica de NO_2^- e NO_3^- com formiato, acetato e propionato por bactérias *anammox*; *interface*: interface; *aerobic*: aeróbia; *anaerobic*: anaeróbia. (Fonte: reproduzido de Kuenen, 2008).

O modelo simplificado acima inclui a possibilidade da formação de nitrito pelas próprias bactérias *anammox*, mas não por bactérias heterotróficas. Quando um reator agitado suavemente, sob limitação de oxigênio, é alimentado com meio suplementado

com amônio, os três tipos de micro-organismos crescem em flocos ou em biofilmes suspensos e competem segundo o acima descrito. Sob baixas concentrações de oxigênio, uma mistura de oxidadoras aeróbias de amônio e bactérias *anammox* serão selecionadas, princípio no qual é baseado o processo CANON (*completely autotrophic nitrogen removal over nitrite*) para remoção de amônio. O nitrato (NO_3^-) que é produzido neste caso é principalmente devido às bactérias *anammox* (KUENEN, 2008).

A atual preocupação com questões relacionadas à desnitrificação promoveu investigações nesta área. Independente de seu papel como nutrientes essenciais às plantas, nitratos tornaram-se poluentes de águas subterrâneas e de superfície, causando grandes problemas para o abastecimento de água potável. N_2O aproxima-se de CO_2 e CH_4 em sua importância como gás de efeito estufa e, juntamente com NO, representa relevante preocupação em termos da química do ozônio na atmosfera (DICKINSON; CICERONE, 1986). Além disso, estações de tratamento de águas residuárias podem contribuir para a emissão de N_2O e o aumento do efeito de estufa (OTTE et al., 1996).

De acordo com Kim e Craig (1993), o tempo de residência do N_2O na atmosfera é estimado em 150 anos. Nas últimas décadas, tem sido observado constante aumento de sua concentração, promovido pelo uso de fertilizantes, queima de biomassa e produção de *nylon* como as contribuições mais significativas para este aumento (COFER et al., 1991; THIEMENS; TROGLER, 1991). Vale ressaltar, também, a importância do fluxo dos gases NO e N_2O entre o solo e a atmosfera, devido a atividades bacterianas (CONRAD, 1996).

A maioria dos micro-organismos desnitrificantes é heterótrofa, mas a habilidade para desnitrificação também é verificada em organismos capazes de utilizar compostos reduzidos de enxofre, H_2 ou Fe^{2+} como doadores de elétrons e crescer quimioautotroficamente (STRAUB et al., 1996). A oxidação de uma fonte inorgânica de

redutor acoplada à redução de um óxido de nitrogênio é denominada desnitrificação autotrófica (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Metabolismo quimioautotrófico. Doadores e receptores de elétrons na assimilação de CO_2 a partir de reações exergônicas de oxidação de compostos inorgânicos. (Fonte: adaptado de material didático gentilmente cedido pelo Prof. J. M. Alfons Stams).

Doador de elétrons	Receptor de elétrons	Fonte de Carbono
Hidrogênio	Oxigênio	CO_2
Sulfeto	Oxigênio	CO_2
Sulfeto	Nitrato	CO_2
Ferro metálico	Oxigênio	CO_2
N-amoniacal	Oxigênio	CO_2
Nitrato	Oxigênio	CO_2
Hidrogênio	Sulfato	CO_2
Hidrogênio	CO_2	CO_2
Hidrogênio	CO_2	CO_2

A definição fenomenológica do processo de desnitrificação é, portanto, a transformação desassimilativa de nitrato ou nitrito em espécies gasosas com conservação de energia (Figura 2.3) – oposta à redução assimilativa dos mesmos oxianions à amônia para fins de biossíntese. A redução de nitrito a amônia, denominada amonificação, não gera força próton motriz. Em *stricto sensu*, o processo de amonificação não pode ser classificado como desnitrificação (ZUMFT, 1997).

Figura 2.3 – Transformações desassimilativas de compostos nitrogenados. (Fonte: modificado de Kartal et al., 2007).

Diferentemente de desnitrificantes autotróficos, bactérias filamentosas do enxofre como *Beggiatoa*, *Thioploca* e *Thiomargarita*, comumente encontradas em sedimentos marinhos, acoplam a oxidação de sulfeto à redução desassimilatória de nitrato a amônia (DNRA) (OTTE et al., 1999; EISENMANN et al., 1995).

Uma de suas vantagens competitivas sobre os desnitrificantes está no fato de que, na superfície do sedimento, o nitrato é assimilado através dos longos filamentos e armazenado em seus vacúolos e, abaixo da superfície nesse ambiente, o sulfeto é oxidado a enxofre elementar e igualmente estocado como reservas de energia (HUETTEL et al., 1996). Com base na termodinâmica, a desnitrificação apresenta vantagem de aproximadamente 60% sobre a DNRA em condições limitantes de sulfeto, enquanto que não é verificada diferença significativa na energia livre quando o nitrato é o fator limitante (JORGENSEN; NELSON, 2004).

A redução desassimilativa de nitrato a amônia (DNRA) é favorecida em sedimentos com elevadas cargas orgânicas, enquanto que a desnitrificação é provavelmente dominante em sedimentos mais oxidados (CHRISTENSEN et al., 2000).

Desta forma, a dominância de desnitrificantes autotróficos em sedimentos com baixa carga orgânica é possivelmente devida à sua habilidade em solubilizar e assimilar FeS em forma sólida. Para sedimentos ricos em matéria orgânica, elevadas concentrações de HS^- geradas por redutores de sulfato promovem o crescimento de micro-organismos que realizam DNRA (SHAO et al., 2010).

A desnitrificação completa pode ser compreendida como um conjunto de quatro módulos de processos respiratórios parcialmente independentes (Figura 2.4), segundo Zumft (1997).

Figura 2.4 – Organização modular do processo de desnitrificação. Quatro módulos representam os sistemas de respiração utilizando nitrato (*a*), nitrito (*b*), NO (*c*) e N_2O (*d*) constituem o processo global. A desnitrificação completa (*h*) é alcançada apenas quando os quatro módulos são ativados. As sobreposições (*e* – *g*) dos módulos de respiração individuais ocorrem naturalmente em desnitrificantes e em outras bactérias redutoras de óxidos de nitrogênio. Designações para os genes: *nar*, respiração de nitrato; *nir*, respiração de nitrito; *nor*, respiração de óxido nítrico; *nos*: respiração de óxido nitroso (Fonte: adaptado e modificado de Zumft, 1997).

Os sistemas de redução de nitrato e N_2O apresentam o maior grau de independência e podem funcionar como processos autônomos mesmo em desnitrificantes completos. Em contraste, as reduções de nitrito e de NO são controladas de forma

interdependente em ambos os níveis transcricional e de atividade enzimática, presumivelmente para evitar acúmulo de NO. Mesmo em um organismo desnitrificante completo, os três complexos respiratórios mantêm certo grau de independência, por responderem a combinações de diferentes sinais internos e externos. Como mostrado na Figura 2.4, a desnitrificação completa só ocorrerá quando os quatro módulos que constituem o processo são expressos e funcionam concomitantemente (ZUMFT, 1997).

As transformações de nitrito e N_2O em NO constituem uma unidade funcional e de regulação mais estreita dentro do processo global de desnitrificação, se comparada às demais reações. A redução de nitrito ocorre na célula se a redução do NO é assegurada por expressão e atividade de regulação interdependentes de nitrito e NO redutases (ZUMFT et al., 1994).

Um óxido de nitrogênio é requerido para a indução da desnitrificação e, em lugar do oxigênio, serve como receptor de elétrons para a geração de gradiente eletroquímico através da membrana citoplasmática. Como uma célula bacteriana geralmente dispõe de elétrons sobre oxidoredutases terminais que utilizam diferentes óxidos de nitrogênio, sua ação resulta na transformação sequencial de nitrato a N_2 (ZUMFT, 1997).

Normalmente, o nitrato é bom indutor para todas as enzimas, mas as propriedades de indução também foram observadas para nitrito, NO e N_2O . A transição para a anaerobiose na presença de nitrato induz a nitrato redutase e a atividade da citocromo *cdI* em *Paracoccus denitrificans*, mas não é suficiente *per se* para ativar a transcrição dos genes *narG*, *nirS* e *nosZ* (BAUMANN et al., 1996).

A primeira etapa da desnitrificação é a redução do nitrato a nitrito. A redução desassimilatória de nitrato geralmente ocorre no espaço periplasmático, em contraste com a oxidação assimilatória de quinol acoplada à redução de nitrato em *Escherichia coli*, que é associada à membrana (NasGHI). O sistema desassimilativo nitrato redutase contém

quatro enzimas-chave: uma molibdo-proteína periplasmática (NapA), um citocromo (NapB), um complexo quinol oxidase citocromo c independente (NapGH) e uma chaperona (NapD) (SHAO et al., 2010).

Existem dois tipos de nitrito redutase que catalisam a redução de nitrito a óxido nítrico: NirK e NirS. O óxido nítrico, o produto de ambos os tipos de nitrito redutase, serve tanto como intermediário como ativador do gene *nirR*, regulando a produção e função de ambas Nir e óxido nítrico redutase (Nor) (TOSQUES et al., 1996).

A nitrito redutase transmembrana é responsável pela remoção do altamente reativo NO. A enzima possui duas subunidades, NorC e NorB. A citocromo tipo *c* NorC recebe elétrons a partir de um doador periplasmático e transfere-os para NorB, que contém dois grupos heme tipo *b* e um Fe não-heme. Alguns desnitrificantes encerram o processo acima com a produção de N₂O, mas a maioria dá continuidade para formar N₂ por meio da catálise de uma N₂O redutase periplasmática contendo Cu (NosZ), que é estruturalmente semelhante à citocromo *c* oxidase (SHAO et al., 2010).

A reação fisiológica do citocromo *cd₁* é a protonação do nitrito e remoção de água para a geração de NO:

O citocromo *cd₁* provoca a nitrosação da hidroxilamina, azidas e aminas (KIM; HOLLOCHER, 1984). A nitrosação de aminas secundárias pode estar relacionada ao potencial carcinogênico do nitrito (CALMELS et al., 1996).

A conversão de NO a N₂O possui potencial redox, E_0' (pH 7), de +1,177 mV e energia livre, $\Delta G^{\circ'}$, de -306,3 kJ/mol. É energeticamente comparável à respiração de N₂O

a N_2 [E_0' (pH 7) = +1,352 mV; $\Delta G^{\circ'}$ = -339,5 kJ/mol] e ambas as reações são termodinamicamente mais favoráveis que a respiração de nitrato a nitrito (ZUMFT; CARDENAS, 1979).

A enzima óxido nítrico redutase catalisa a redução de NO a N_2O :

Uma vez que a reação envolve a dimerização de espécies mononitrogênio para formar a ligação N–N, a reação global requer dois elétrons (BELL et al., 1992).

A enzima N_2O redutase catalisa a redução de dois elétrons de N_2O a N_2 e água:

Termodinamicamente, N_2O é um potente reagente de transferência de oxigênio (HOLM, 1987), ainda que na ausência de um agente ativador (comumente um metal de transição), é extremamente inerte, quando comparado a N_2 (BANKS et al., 1968).

O genoma de *Thiobacillus denitrificans* codifica todos os genes necessários para a desnitrificação completa, como descrito na Tabela 2.4. O sequenciamento dos genomas completos de dois desnitrificantes autotróficos, *S. denitrificans* e *Sulfurovum* sp. NBC37-1, pertencentes a ϵ -*Proteobacteria*, indicou que também possuem todos os genes necessários para realizar a desnitrificação completa. *Thiohalomonas denitrificans*, uma γ -*Proteobacteria* halofílica, foi identificada como possuindo *nirS* codificado em seu genoma (SOROKIN et al., 2007a).

Thiobacillus denitrificans possui a habilidade incomum de oxidar enxofre tanto sob condições aeróbicas quanto anóxicas (desnitrificação). Desta forma, faz-se necessário

conhecer se diferentes sistemas enzimáticos oxidadores de enxofre são utilizados em função das distintas condições. Análises empregando o método transcricional do genoma completo baseado em *microarrays* e RT-PCR indicaram que a maioria dos genes associados à oxidação de enxofre são constitutivamente expressos. Entretanto, o gene *sqr* e algumas das oito cópias do gene *dsrC* codificando um transportador de elétrons revelaram-se *up* regulados sob condições desnitrificantes (BELLER et al., 2006b).

Tabela 2.4 – Elementos metabólicos-chave dos genomas completos sequenciados de desnitrificantes autotróficos. (Fonte: adaptado de Shao et al., 2010).

	Oxidação do enxofre	Desnitrificação
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Sqr, Fcc, Sox (exceto SoxCD), Dsr	NarKK2GHJI, NirS, NorCB, NosZ
<i>Sulfurovum</i> sp. NBC37-1	Sqr, Sox, SorAB	NapABHGFLD, NirS, NorCB, NosZ
<i>Sulfurimonas denitrificans</i>	Sqr, Sox	NapABHGFLD, NirS, NorCB, NosZ
<i>Thioalkalivibrio</i> sp. HL-EbGR7 (aeróbia obrigatória)	Sox (exceto SoxCD), Dsr	–

Sox: sulfito oxidase; Sor: sulfito oxidase; Dsr: redução de sulfito a sulfeto; Nap: nitrato redutase periplasmática; Nir: nitrito redutase; Nor: óxido nítrico redutase; Nos: óxido nitroso redutase.

Ambos *S. denitrificans* e *Sulfurovum* sp. NBC37-1 são membros de ϵ -*Proteobacteria*. Possuem o *cluster* completo do gene *sox* em seus genomas. A formação de enxofre elementar não foi reportada para *S. denitrificans*, fato em concordância com a presença de *soxCD* e ausência do *cluster* do gene *dsr* em seu genoma. Entretanto, o acúmulo de enxofre foi detectado em uma espécie filogeneticamente próxima, *Thiomicrospira* CVO, refletindo a diversidade metabólica dentro de ϵ -*Proteobacteria*. De modo semelhante, análises para sulfito desidrogenase igualmente indicaram que outras *Sulfurimonas* spp. (*S. autotrophica* ou *S. paralvinellae*) não utilizam o sistema *sox* nem qualquer versão modificada dele (SIEVERT et al., 2008).

As informações genéticas disponíveis sobre desnitrificantes autotróficos alcalifílicos e halofílicos (*Thioalkalivibrio*, *Thiohalomonas*, *Thiohalophilus*, *Thioalkalispira* e *Thiohalorhabdus*) são escassas. Entretanto, o genoma completo de um quimioautotrófico alcalifílico aeróbio, *Thioalkalivibrio* sp. HL-EbGR7, foi recentemente sequenciado e vale ressaltar que, surpreendentemente, nenhuma enzima semelhante pôde ser alinhada com qualquer uma das sulfito oxidases atualmente conhecidas (*sox*, *sor* ou *apr*). Os sulfitos são altamente reativos e, portanto, são compostos potencialmente tóxicos. Os mecanismos adotados por alcalifílicos para remoção de sulfito ainda constituem uma questão remanescente (SHAO et al., 2010).

2.2 Populações microbianas associadas ao processo de desnitrificação

Micro-organismos que apresentam a capacidade para desnitrificação exibem elevada diversidade taxonômica e abrangem vasta gama de características fisiológicas, sendo a maior parte pertencente às subclasses α -, β -, γ - e ϵ -*Proteobacteria*, ao grupo de bactérias Gram-positivas e ao Domínio *Archaea* (PHILIPPOT, 2005; SHAO et al., 2010).

A Tabela 2.5 apresenta gêneros e espécies de alguns micro-organismos desnitrificantes agrupados de acordo com seu principal modo de crescimento ou de outra característica fisiológica predominante. A Figura 2.5 apresenta os principais gêneros desnitrificantes autotróficos, especificamente.

São grupos recentemente reconhecidos entre os micro-organismos desnitrificantes alguns membros de *Archaea* hipertermofílicas e alcalifílicas (AHN, 2006; LEE et al., 2008), as espécies de bactérias *Acidovorax delafieldii* e *Acidovorax temperans*, *Hyphomicrobium denitrificans* e *Brachymonas denitrificans* e bactérias *anammox*. Enzimas envolvidas no processo de desnitrificação foram igualmente identificadas em mitocôndrias de alguns fungos (ZUMFT, 1997).

Tabela 2.5 – Gêneros e espécies de alguns exemplos de micro-organismos desnitrificantes, agrupados de acordo com o modo de crescimento ou outra característica fisiológica predominante.

Bacteria (Gram-negativas)

Fototróficas	Oxidadoras de nitrito e amônia	Anaeróbias facultativas	Termofílicas
<i>Rhodobacter</i> <i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Nitrobacter</i> <i>Nitrosomonas</i>	<i>Alteromonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Aquifex</i> <i>Bacillus</i> <i>Thermothrix</i> <i>Aquaspirillum</i>
Litotróficas oxidadoras de S	Organotróficas	Aeróbias	Psicrofílicas e Halofílicas
<i>Beggiatoa</i> <i>Thiobacillus</i> <i>Thioploca</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Zavarzinia</i> <i>Aquaspirillum</i> <i>Hyphomicrobium</i>	<i>Paracoccus</i> <i>Alcaligenes</i>	<i>Halomonas</i> <i>Halomonas</i> <i>Bacillus</i>
Litotróficas Oxidadoras de H₂	Fermentativas	Diazotróficas	Outros grupos
<i>Ralstonia</i> <i>Paracoccus</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Empedobacter</i> <i>Azospirillum</i>	<i>Aquaspirillum</i> <i>Azospirillum</i> <i>Azoarcus</i> <i>Bacillus</i> <i>Rhodobacter</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Sinorhizobium</i>	<i>Chromobacterium</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Blastobacter</i> <i>Hyphomicrobium</i> <i>Cytophaga</i> <i>Flexibacter</i>
<i>Bacteria</i> (Gram-positivas)		<i>Archaea</i>	
Organotróficas		Organotróficas	
Formadores de esporos	Não-formadores de esporos	Halofílicas	Hipertermofílicas
<i>Bacillus</i>	<i>Jonesia</i>	<i>Haloarcula</i> <i>Halobacterium</i> <i>Haloferax</i>	<i>Pyrobaculum</i>

(Fonte: adaptado e modificado de Zumft, 1997).

Atualmente, cinco gêneros *anammox* foram descritos, com identidades de sequências de RNAr 16S entre 87 e 99%. Apesar dessa relativamente grande distância filogenética, todos os organismos *anammox* pertencem ao mesmo grupo monofilético denominado Brocadiales e são associados à ordem Planctomycetales. Quatro gêneros “*Candidatus*” *anammox* foram isolados a partir de lodos ativados: *Kuenenia*, *Brocadia*,

Anammoxoglobus e *Jettenia*. O quinto gênero, *Candidatus Scalindua*, foi detectado em ambientes naturais, especialmente sedimentos marinhos e zonas de oxigênio mínimo (JETTEN et al., 2009).

Thiobacillus denitrificans foi o primeiro micro-organismo desnitrificante autotrófico isolado e caracterizado, há mais de um século (BEIJERINCK, 1904). Entretanto, as pesquisas acerca da desnitrificação autotrófica intensificaram-se apenas a partir de 1991, proporcionando o reconhecimento de seu papel dominante no ciclo do nitrogênio em determinados ecossistemas, superando a desnitrificação heterotrófica (BRETTAR, 1991).

Thiobacillus denitrificans e *Sulfurimonas denitrificans* (anteriormente *Thiomicrospira denitrificans*) podem reduzir nitrato a gás nitrogênio enquanto oxidam compostos reduzidos de enxofre a sulfato ou a enxofre elementar (ZHANG et al., 2009) e são os desnitrificantes autotróficos mais comumente relatados. O sequenciamento do genoma completo para ambas as espécies foi concluído (BELLER et al., 2006a; SIEVERT et al., 2008). Outros desnitrificantes autotróficos foram isolados e identificados a partir de habitats naturais como fontes hidrotermais, sedimentos marinhos, lagos, bem como em ambientes modificados por ação antrópica como campos de petróleo, no subsolo de tanque de armazenamento de petróleo e estações de tratamento de águas residuárias (ZHANG et al., 2009).

Entre as bactérias carboxidotróficas, apenas *Pseudomonas carboxydohydrogena* cresce autotroficamente em condições desnitrificantes com H_2 como doador de elétrons e CO_2 como fonte de carbono. A oxidação do CO não é acoplada a um crescimento desnitrificante em bactérias carboxidotróficas atualmente conhecidas. *Pseudomonas carboxydoflava* expressa a via completa da desnitrificação, mas é sensível ao CO na redução de N_2O . *P. carboxydohydrogena*, *Zavarzinia* (anteriormente *Pseudomonas*)

compransoris e *Pseudomonas gazotropha* terminam a desnitrificação em N_2O (MEYER et al., 1990).

A diversidade de micro-organismos é um importante aspecto da desnitrificação autotrófica e promove interpretações comparativas e evolutivas. Até o presente, 14 espécies válidas descritas pertencentes às subclasses α -, β -, γ - e ϵ - de *Proteobacteria*, mostraram a capacidade para desnitrificação autotrófica *stricto sensu*. Além dessas, algumas espécies são capazes apenas de reduzir nitrato a nitrito utilizando enxofre como doador de elétrons. A filogenia e a fisiologia da bactéria desnitrificante autotrófica *Thiomicrospira* CVO foram extensivamente caracterizadas, apesar da indisponibilidade de uma descrição válida (GEVERTZ et al., 2000). A árvore filogenética baseada no gene RNAr 16S abrangendo espécies-tipo de desnitrificantes autotróficos está apresentada na Figura 2.5.

Figura 2.5 – Relações filogenéticas de espécies-tipo de desnitrificantes autotróficos baseadas no gene RNAr 16S. Neighbor-joining, Jukes-Cantor-corrected DNA distances. Valores de distâncias de bootstrap (>60%) estão indicados em cada ramo. (Fonte: Shao et al., 2010).

2.3 Ciclo Biogeoquímico do Enxofre e doadores de elétrons para a Desnitrificação Autotrófica

O enxofre está entre os elementos mais abundantes na Terra. Os maiores reservatórios estão sob a forma de sulfetos de ferro (pirita, FeS_2) e gesso (CaSO_4) em sedimentos e rochas (7800×10^{18} g de enxofre) e como sulfato nos oceanos (1280×10^{18} g de enxofre). O enxofre, que é um elemento essencial à vida, é assimilado como sulfato por micro-organismos e plantas e, subsequentemente, por animais. A decomposição de organismos mortos na ausência de oxigênio libera novamente o enxofre como sulfeto de hidrogênio. A queima de combustíveis fósseis e as emissões de vapores vulcânicos liberam dióxidos de enxofre para a atmosfera que, reagindo com a água, formam ácido sulfúrico e resultam em chuva ácida (MUYZER; STAMS, 2008).

O ciclo do enxofre é complexo, pois esse elemento apresenta amplo espectro de estados de oxidação, desde -2 (completamente reduzido) a +6 (completamente oxidado) e pode ser transformado tanto quimicamente quanto biologicamente. Além disso, o ciclo do enxofre encontra-se intimamente associado a outros ciclos, como o do carbono e do nitrogênio. Os micro-organismos efetuam uma parte importante nas transformações do enxofre (Figura 2.6). O enxofre é assimilado como nutriente e reduzido a sulfeto, que é incorporado em aminoácidos e enzimas contendo enxofre. Reações de oxidação e redução para a geração de energia metabólica são igualmente importantes, como a oxidação de sulfeto por bactérias quimiolitotróficas do enxofre e a redução dissimilatória de sulfato por bactérias redutoras de sulfato (SRB), segundo Muyzer e Stams (2008).

Figura 2.6 – Transformações envolvendo compostos de enxofre. SH: sulfidril; chemolithotrophic oxidation: oxidação quimiolitotrófica; oxic: óxico; sulphate assimilation: assimilação de sulfato; SH groups of proteins: proteínas contendo grupos sulfidril; desulphurylation: dessulfurilação; SO_4^{2-} reduction: redução de sulfato; anoxic: anóxico; sulphur disproportionation: dismutação de enxofre; S^0 reduction: redução de enxofre elementar; phototrophic and chemolithotrophic oxidation: oxidação fototrófica e quimiolitotrófica. (Figura reproduzida de Muyzer; Stams, 2008).

Bactérias redutoras de sulfato (SRB) possuem um papel fundamental no ciclo do enxofre. Utilizam sulfato (SO_4^{2-}) como receptor final de elétrons na degradação de matéria orgânica, que resulta na produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S). Subsequentemente, o sulfeto pode ser oxidado aerobiamente por bactérias quimiolitotróficas oxidadoras de enxofre (*Thiobacillus* ou *Beggiatoa* spp., por exemplo) ou anaerobiamente por bactérias fototróficas do enxofre (como *Chlorobium* spp.) a enxofre elementar (S^0) e SO_4^{2-} . Outras transformações, conduzidas por grupos especializados de micro-organismos, resultam na redução do enxofre (por exemplo,

Desulfuromonas spp.) ou na dismutação do enxofre (*Desulfovibrio sulfodismutans*). Compostos orgânicos de enxofre, como dimetilsulfóxido (DMSO) pode ser transformado em dimetilsulfeto (DMS) e *vice versa* por diversos grupos de micro-organismos (MUYZER; STAMS, 2008).

Em tratamentos convencionais, a eliminação biológica de nitrogênio das águas residuárias exige processo em duas etapas: nitrificação seguida de desnitrificação. A nitrificação consiste em uma oxidação quimiolitoautotrófica de amônia a nitrato sob condições aeróbias estritas, que é realizada em duas fases oxidativas sequenciais: a oxidação de amônia e a oxidação de nitrito. A desnitrificação envolve a redução de nitrato a nitrogênio gasoso por bactérias anaeróbias facultativas que utilizam nitrato ou nitrito como receptores de elétrons.

Segundo Foresti et al. (2006), durante o tratamento de esgotos domésticos, a remoção de nitrogênio de efluentes anaeróbios requer a adição de doadores externos de elétrons, em um processo tradicional de nitrificação/desnitrificação. Isto representa uma oportunidade para explorar o uso de doadores de elétrons produzidos em reatores anaeróbios. Dentre esses, VFA (*volatile fatty acids*), metano, amônia e sulfeto são candidatos naturais.

A desnitrificação com compostos reduzidos de enxofre como doadores de elétrons é uma alternativa à desnitrificação heterotrófica tanto para águas residuárias com baixas e médias concentrações de nitrato (como esgoto sanitário), como para aquelas com elevada concentração de nitrato e baixo conteúdo de matéria orgânica (CAMPOS et al., 2007).

Interações entre os ciclos do enxofre e do nitrogênio representam possibilidade real de promover a remoção de ambos os compostos de águas residuárias, de acordo com Foresti et al. (2006). A desnitrificação utilizando compostos reduzidos de enxofre (HS^- , H_2S , S_0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ou SO_3^{2-} , entre outros) como doadores de elétrons foi relatada por

Hulshoff Pol et al. (1998), Reyes-Avila et al. (2004), Cardoso et al. (2006), Foresti et al. (2006), Campos et al. (2007).

Em sistemas de tratamento de águas residuárias, os micro-organismos desnitrificantes autotróficos têm que competir também com as espécies heterotróficas por nitrato, o receptor final de elétrons comum a ambos os grupos (VAIOPOULOU et al., 2005).

Como a desnitrificação é um processo de óxido-redução, as reações termodinâmicas envolvidas – utilizando acetato e sulfeto – devem influenciar a eficiência global do processo. A atividade biológica da biomassa irá também determinar as taxas de reação (REYES-AVILA et al., 2004).

A presença de compostos de enxofre e nitrato em quantidades estequiométricas é de fundamental importância para o crescimento da biomassa e operação do sistema de desnitrificação autotrófica. Resultados encontrados na literatura mostram a importância do tipo da fonte de enxofre sobre os produtos intermediários e finais obtidos (CARDOSO et al., 2006).

Perez et al. (2007) enfatizaram a viabilidade do processo de remoção biológica de nitrogênio para tratar água residuária por meio de nitrificação/desnitrificação autotrófica, com resultados muito satisfatórios. A substituição da desnitrificação heterotrófica pela autotrófica resultou em eficiências equiparáveis, acompanhadas de redução de custos.

Manconi et al. (2007) mostraram que águas residuárias nitrificadas podem ser tratadas em sistema de lodos ativados com tiosulfato ou sulfeto como doadores de elétrons. Seus resultados revelaram que a eficiência de remoção de nitrato é uma função da razão nitrogênio/enxofre (N/S) utilizada.

Mahmood et al. (2007) indicaram que, devido ao fato de utilizarem compostos inorgânicos como fonte de carbono, micro-organismos desnitrificantes autotróficos não

requerem fontes orgânicas desse elemento, resultando menor produção de biomassa, com consequente redução do lodo e dos custos do processo.

Na desnitrificação autotrófica com o uso de sulfeto presente nos efluentes líquidos e gasosos de reatores anaeróbios, além da vantagem fundamental da redução de custos – por não ser necessária a adição de fontes orgânicas de doadores de elétrons, como metanol ou etanol – é ainda verificada a remoção simultânea de enxofre e nitrato. Os produtos finais resultantes da oxidação do enxofre, como os sulfatos, não representam perigo ao ambiente e podem ser despejados diretamente nos corpos hídricos, de acordo com Kleerebezem e Mendez (2002).

2.4 Sistemas aeróbio-anaeróbio combinados para tratamento de águas residuárias

Sistemas biológicos aeróbio-anaeróbio combinados são alternativas promissoras para o tratamento de águas residuárias industriais e domésticas, pois englobam tanto a remoção de material orgânico quanto a de nutrientes.

Segundo Abreu e Zaiat (2008), a combinação dos dois processos tem por objetivo usufruir as vantagens de cada um, minimizando seus aspectos negativos. Desta forma, busca-se a maior remoção da matéria orgânica (característica de reatores aeróbios), além de sistemas mais compactos, com menor produção de lodo e menores custos de implantação e operação (vantagens dos sistemas anaeróbios).

De acordo com Araújo Jr (2006), a alta eficiência da desnitrificação obtida com reatores conjugados relaciona-se com a possível utilização dos gases gerados no reator anaeróbio, principalmente metano (CH_4) e sulfeto de hidrogênio (H_2S), como doadores de elétrons para a redução do nitrato a nitrogênio gasoso. No caso de reatores separados, o metabolismo desnitrificante provavelmente teria como fator limitante a baixa

concentração de doadores de elétrons compatíveis (como matéria orgânica facilmente biodegradável, metano e sulfeto).

As variações no projeto do reator, a condição de operação e a composição do afluente podem resultar em mudanças na comunidade microbiana presente em sistemas aeróbios e anaeróbios. Portanto, a avaliação das interações entre os micro-organismos presentes torna-se importante tanto no projeto quanto no controle do reator anaeróbio, segundo Akarsubasi et al. (2006).

2.5 Imobilização de biomassa em reatores

Sistemas que utilizam células imobilizadas podem proporcionar crescimento regulado da biomassa, por meio de limitação por substrato, evitando, assim, os problemas associados ao excesso de lodo, de especial interesse para as indústrias.

No caso da utilização de biomassa imobilizada em suporte inerte ocorre a formação de biofilme aderido à superfície do suporte, que predomina sobre culturas livres em suspensão. Neste biofilme, é verificada a criação de microambientes pela interação entre as espécies, proporcionando grande estabilidade das colônias e favorecendo o conjunto como um todo (ARAUJO JR, 2006).

Entretanto, Varesche et al. (1997) e Ratusznei et al. (2000) destacaram ser preciso considerar possíveis resistências à transferência de massa entre as fases líquida e sólida, que podem ser limitantes do processo de conversão e causar decréscimo na velocidade global de reação. Nessa constatação reside a importância da escolha de material adequado a ser utilizado como suporte, para a formação do biofilme e retenção da biomassa no interior do reator. Devem ainda ser consideradas as características da água residuária e as condições hidrodinâmicas do sistema, por interferirem diretamente na adesão microbiana e na manutenção do biofilme.

2.6 Investigação de populações microbianas por meio de Técnicas de Biologia Molecular

Técnicas de fingerprint, com seu potencial para prover rápida visão sobre os membros dominantes de uma comunidade microbiana, podem ser escolhidas como métodos para acessar a diversidade microbiana de modo geral, bem como a de grupos taxonômicos específicos, pelo uso de conjunto de primers com especificidades diferenciadas (HÖFLE et al., 2005). Desta forma, permitem realizar o monitoramento das populações predominantes nos reatores ao longo das sucessivas etapas de operação de um sistema.

Métodos de Biologia Molecular baseados no gene RNAr 16S têm sido aplicados para analisar comunidades microbianas que colonizam reatores (MUYZER et al., 1993; ALFREIDER et al., 2002; ROEST et al., 2005; KOENIG et al., 2005; SARTI et al., 2006; DE BOK et al., 2006; DIAZ et al., 2006; OKABE et al., 2007; NAKATSU, 2007; SOUSA et al., 2007; WEELINK et al., 2007; LEE et al., 2008; BERESCHENKO et al., 2008; FREEMAN et al., 2008; VAN LEERDAM et al., 2008 a, b).

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) é um método molecular que separa fragmentos parcialmente desnaturados de DNA dupla fita de tamanho semelhante, porém de diferente composição de nucleotídeos, com base no princípio de sua mobilidade diferencial. Tais fragmentos são produzidos por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Uma vez que a amplificação por PCR ocorre apenas para as fitas de DNA molde que sejam complementares aos *primers* utilizados específicos para um gene, o método fornece informações diretas sobre a presença e diversidade da população microbiana que realize uma determinada função biológica, como a desnitrificação, por exemplo.

Após a amplificação por PCR dos fragmentos deste gene de interesse, os produtos podem ser aplicados em um gel de DGGE ou clonados em um vetor e então sequenciados. Esta etapa da PCR envolvendo *primers* específicos para abranger o gene de interesse exclui os micro-organismos que não tenham importância para o estudo e pode proporcionar a diferenciação entre gêneros ou espécies de bactérias presentes no reator, além da análise detalhada para grupos microbiológicos que apresentem características metabólicas em comum.

Dado que produtos de PCR de determinada reação apresentam tamanho similar (expresso em pares de bases), a separação convencional por eletroforese em gel de agarose resulta apenas em uma banda de DNA por amostra. A técnica de DGGE pode superar essa limitação, separando os produtos de PCR com base nas diferenças entre as sequências que resultam em características de desnaturação diferencial do DNA. Durante a DGGE, produtos de PCR migram através de um gel de poliacrilamida sob concentrações crescentes de desnaturantes químicos (geralmente ureia e formamida).

Sequências de DNA de diferentes bactérias apresentam distintos pontos de fusão de sua dupla fita em concentrações desnaturantes, resultando padrões de bandas diferentes. Uma vez desnaturada, a molécula de DNA de fita simples tem sua mobilidade significativamente diminuída em comparação com a da molécula helicoidal dupla fita (MUYZER et al., 1993).

Fischer e Lerman (1980) propuseram a interpretação que uma molécula de DNA dupla fita migra em um gel de gradiente desnaturante até que sua última região estável seja fundida. Assim, alterações nas sequências de pares de bases em um domínio de fusão podem ter um impacto significativo na mobilidade da molécula como um todo.

Desta forma, os padrões de bandas gerados refletem diretamente a biodiversidade genética da amostra e o número de bandas reflete a complexidade da comunidade e a

diversidade relativa das espécies que a compõem. Teoricamente, cada banda representa uma diferente espécie presente na comunidade, cuja sequência pode ser comparada àquelas depositadas em bases de dados para determinar diferenças estruturais entre ambientes ou entre tratamentos (GREEN et al., 2009).

Uma sequência rica em guanina e citosina (GC) é incorporada a um dos *primers* (MYERS et al., 1985). Este *GC-clamp*, geralmente contendo 40 bases e posicionado na extremidade 5' do *primer*, é incorporado a todos os amplicons gerados durante a PCR. Este artefato impede a desnaturação completa dos produtos, o que resultaria em fragmentos de fita simples migrando para fora do gel. Embora a mobilidade diferencial de moléculas de DNA no gradiente de desnaturação seja geralmente consistente com o conteúdo GC, outros aspectos devem ser considerados.

Com a crescente disponibilidade de *primers* descritos na literatura científica, a técnica de DGGE também pode ser utilizada para investigações filogenéticas ou para micro-organismos específicos, como patógenos ou degradadores de xenobióticos (SANZ; KOCHLING, 2007).

A técnica de PCR/DGGE pode ser aplicada no monitoramento da dinâmica de comunidades microbianas ao longo de sucessões ecológicas, associadas a alterações ambientais ou processos biotecnológicos – como na digestão anaeróbia, em função de distintos tipos e configurações de reatores, condições operacionais, natureza de inóculo, tipo de resíduo a ser tratado. Permite monitoramento espaço-temporal rápido e simples da diversidade de populações microbianas de grande número de amostras, tomando-se por base apenas padrões de bandas (SANZ; KOCHLING, 2007).

A aplicação da DGGE para o campo da ecologia microbiana foi iniciada por Gerard Muyzer e colaboradores, em 1993, quando caracterizaram uma comunidade microbiana complexa por meio de PCR (SAIKI et al., 1986) e DGGE de genes do RNA

ribossômico (RNAr). Os amplicons produzidos nesse estudo foram analisados por DGGE, resultando em um complexo padrão de bandas representando as populações bacterianas predominantes *in situ*.

Para a aplicação da DGGE, as características mais úteis dos genes RNAr incluem: sua presença no genoma de todos os organismos conhecidos; sua estrutura altamente conservada e a mistura de regiões altamente conservadas e altamente variáveis; aumento da disponibilidade de sequências em bases de dados e o tamanho do gene, que permite realizar inferências filogenéticas. As regiões V3 a V5 do gene RNAr 16S amplificados pelo conjunto de *primers* estabelecidos por Muyzer (MUYZER et al., 1993) estão entre as mais utilizados para análises de comunidades microbianas (GREEN et al., 2009). O conjunto de *primers* utilizados nas reações PCR/DGGE desta pesquisa de doutorado (968 F e 1492 R) correspondem às regiões variáveis V6 a V8 do gene RNAr 16S.

Entretanto, Sánz e Kochling (2007) ressaltaram que a obtenção de DNA genômico em quantidade e qualidade representativas por meio de extração e amplificação pode representar obstáculo metodológico, dependendo da natureza da amostra. O número de cópias de DNA após a amplificação – que depende da abundância de um micro-organismo em particular e da facilidade de amplificação de seu gene RNAr 16S – pode ser muito diferente para duas populações.

Ademais, fragmentos com variações na sequência de bases do gene RNAr 16S podem também apresentar mobilidades semelhantes e uma única espécie pode apresentar várias cópias distintas do gene RNAr 16S, gerando mais de uma banda. Muyzer et al. (1993) sugeriram que qualquer DNA alvo que esteja em proporção inferior a 1% do total na amostra provavelmente não será detectado por DGGE. Desta forma, análises de DGGE devem ser consideradas para representar apenas organismos predominantes ou filotipos em uma comunidade.

Contudo, é possível delimitar um panorama da estrutura de uma comunidade microbiana por meio da aplicação combinada de diferentes métodos de Microbiologia e Biologia Molecular, de modo a superar determinadas limitações de algumas técnicas e, ao mesmo tempo, usufruir de vantagens inerentes a outras.

O interesse no conhecimento da microbiologia de reatores desnitrificantes está evidenciado em trabalhos de pesquisa recentes dos grupos do Laboratório de Processos Biológicos (LPB/EESC/USP) tais como em Souza (2011), Pantoja Filho (2011) e Moraes (2012).

Pantoja Filho (2011) empregou reator aeróbio-anóxico de leito fixo (RAALF) constituído de duas câmaras sobrepostas como alternativa para o pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios para a remoção de matéria orgânica carbonácea e de nitrogênio via nitrificação/desnitrificação. Por meio de análises microbiológicas como NMP específicas para diversos grupos bacterianos e microscopias óptica e de varredura, foi possível a detecção de micro-organismos associados aos ciclos do nitrogênio e do enxofre e às etapas da digestão anaeróbia no microambiente do reator, elucidando suas funções metabólicas nesses processos em estudo.

Moraes (2012) propôs a aplicação dos processos de nitrificação e desnitrificação autotrófica acoplados à oxidação de sulfeto em um único reator, de leito fixo e operado em batelada alimentada sequencial e submetido a condições de aeração intermitente, para a remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário, empregando a desnitrificação autotrófica com o uso de sulfeto presente no efluente como doador de elétrons. As leituras de NMP para bactérias oxidadoras de nitrogênio amoniacal, bactérias oxidadoras de nitrito, micro-organismos desnitrificantes heterotróficos e autotróficos, juntamente com os exames microscópicos, auxiliaram na compreensão dos resultados obtidos a partir das análises físico-químicas, contribuindo

para a elucidação dos fenômenos observados durante as distintas condições de partida e alimentação do reator.

O presente estudo alinhou-se com as propostas das pesquisas acima citadas: obter a caracterização microbiológica para complementar e auxiliar a compreensão dos fenômenos verificados ao longo do período de operação dos reatores empregados por Souza (2011).

Apesar do interesse científico e tecnológico da desnitrificação com o uso de compostos reduzidos de enxofre, a estrutura das comunidades microbianas associadas ao processo é pouco conhecida. O conhecimento atual da diversidade microbiana autotrófica desnitrificante é muito limitado e os estudos existentes consideram apenas comunidades microbianas em reatores de pequena escala (KOENIG et al., 2005).

Sarti et al. (2006) ressaltaram que, apesar dos esforços para melhorar o tratamento de águas residuárias, há poucos estudos sobre caracterização das populações microbianas que colonizam bioreatores anaeróbios e que pouco se conhece sobre a comunidade microbiana que se desenvolve em tais ambientes. Não são conhecidos os fatores que poderiam conduzir à colonização microbiana durante o tratamento nem é sabido se o suporte utilizado na imobilização favoreceria algumas populações específicas e sob quais condições tal evento ocorreria, por exemplo. Este conhecimento possibilita analisar vantagens e/ou desvantagens dos sistemas durante o tratamento anaeróbio, comumente avaliados pela eficiência de remoção da matéria orgânica.

É necessário aprofundar no conhecimento dos micro-organismos envolvidos nas transformações do nitrogênio para compreender e eventualmente compensar os efeitos negativos das poluições a esse elemento associadas (JETTEN et al., 2009).

A proposta deste estudo apresentou como foco a caracterização de tais comunidades em dois sistemas de reatores, um deles de configuração inédita, por meio da

obtenção de dados relativos à diversidade, enumeração por técnicas baseadas em cultivo e identificação de micro-organismos por métodos biomoleculares. O desconhecimento das comunidades microbianas que colonizam e se estabelecem em reatores desnitrificantes aplicados ao tratamento de esgotos sanitários submetidos a doadores de elétrons orgânicos e inorgânicos fundamentou a hipótese desta pesquisa de que a comunidade microbiana reflete a multiplicidade de processos em um sistema complexo. Algumas das questões levantadas a partir dessa hipótese são: quais micro-organismos estão envolvidos nos processos de digestão anaeróbia e desnitrificação nos reatores estudados? *Thiobacillus denitrificans* e semelhantes são encontrados nesses sistemas? Há predominância de alguma espécie ou grupo taxonômico? Quais populações de micro-organismos estão presentes em um sistema complexo, em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas?

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo focou a investigação dos aspectos microbiológicos do processo de desnitrificação heterotrófica e autotrófica com o uso de sulfeto como doador de elétrons em reatores com células imobilizadas. Foram avaliados os efeitos dos modos de operação dos reatores desnitrificantes que compunham os sistemas sobre a biomassa em cada uma das diferentes configurações.

Constituíram os objetivos específicos:

- Monitorar a colonização microbiana ao longo dos períodos de operação e como função das diferentes condições impostas aos reatores;
- Associar o estabelecimento e manutenção das populações, juntamente com características metabólicas de alguns micro-organismos, com o desempenho de sistemas de reatores combinados para o tratamento de águas residuárias;
- Quantificar e identificar os micro-organismos presentes nos reatores operados por meio de técnicas de Microbiologia e Biologia Molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Planejamento dos Ensaios

Todos os experimentos abaixo descritos foram realizados nas dependências do Laboratório de Processos Biológicos (LPB), do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP).

Os procedimentos e protocolos foram desenvolvidos a partir das amostras coletadas de dois sistemas de reatores aplicados ao tratamento de esgotos sanitários, operados pelo Dr. Eng. Theo Syrto Octavio de Souza, como parte de seu trabalho de pesquisa de doutorado (SOUZA, 2011).

O primeiro sistema foi composto por três reatores contínuos em escala de bancada, simulando unidades típicas de estações capazes de promover tratamento secundário e terciário: um reator UASB para produção de efluente anaeróbico, um reator nitrificante aeróbico de leito móvel e um reator anóxico desnitrificante. Os estudos foram intensificados sobre o reator desnitrificante, alimentado com proporções variáveis de efluente nitrificado (proveniente do reator aeróbico nitrificante alimentado com esgoto sanitário sintético) e não nitrificado (proveniente do reator anaeróbico) e mantido sob condições autotróficas, devido à baixa concentração de matéria orgânica nesta composição de efluentes (SOUZA, 2011).

O segundo sistema de reatores foi formado por dois reatores de fluxo ascendente: um reator compartimentado anaeróbico/anóxico para remoção da matéria orgânica e desnitrificação e um reator aeróbico nitrificante. O objetivo do emprego deste sistema foi a aplicação do processo de desnitrificação autotrófica ao pós-tratamento de efluentes de

reatores anaeróbios aplicados a esgoto sanitário (SOUZA, 2011). A Figura 4.1 apresenta brevemente a caracterização das amostras e os ensaios a que foram submetidas.

	Água residuária	Reatores	Condições estudadas	Ensaio
Sistema de bancada	Esgoto sanitário sintético	Sistema de 3 reatores contínuos em escala de bancada - Digestão anaeróbia: R1 - Nitrificação: R2 - Desnitrificação: R3	Reator R3 C4: adição de alcalinidade e sulfeto C5: adição de alcalinidade C7: adição de sulfeto	- PCR/DGGE - Sequenciamento de bandas - PCR <i>primers</i> específicos
Sistema piloto	Esgoto sanitário real	Sistema piloto com reatores compartimentados - Reator anaeróbio/ anóxico - Reator nitrificante	Reator anaeróbio/anóxico C1: efluente não nitrificado C2: 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado C3: efluente nitrificado e não nitrificado (40 – 60%)	- Microscopia óptica - NMP heterotróficas - NMP autotróficas - PCR/DGGE - Sequenciamento de bandas - PCR <i>primers</i> específicos - Clonagem e sequenciamento

Figura 4.1 – Ensaio microbiológicos e biomoleculares a que foram submetidas as amostras coletadas do reator desnitrificante R3 em escala de bancada e do reator anaeróbio/anóxico em escala piloto, nas diferentes condições de alimentação. (Fonte: autor do trabalho).

A biomassa dos reatores desnitrificantes de ambos os sistemas foi imobilizada em cubos de espuma de poliuretano contidos no interior de cilindros de polipropileno, de modo a conferir resistência estrutural às matrizes de espuma.

A biomassa aderida aos suportes foi extraída das matrizes à conclusão de cada condição operacional em estudo (com duração aproximada de 30 dias). O lodo desprendido das espumas de poliuretano foi destinado a dois principais grupos de

análises: para o estudo da diversidade microbiana e para a investigação das populações desnitrificantes estabelecidas nos reatores.

4.2 Reatores (SOUZA, 2011)

Os sistemas de reatores descritos abaixo foram projetados e operados pelo Dr. Eng. Theo Syrto Octavio de Souza (SHS/EESC/USP), como parte de seu trabalho de pesquisa, sob a orientação do Prof. Tit. Eugênio Foresti. Os dois sistemas distintos estão brevemente caracterizados neste item, de acordo com Souza (2011).

4.2.1 Sistema de reatores contínuos em escala de bancada (SOUZA, 2011)

Os três reatores contínuos em escala de bancada operados para a remoção de matéria orgânica e compostos nitrogenados de esgoto sanitário sintético foram: um reator anaeróbio com configuração UASB (R1) para remoção da matéria orgânica da água residuária inicial; um reator aeróbio de leito móvel (R2) para nitrificação do efluente do reator R1 e um reator anóxico com configuração UASB (R3) para desnitrificação da mistura dos efluentes de R1 e R2. O esquema geral deste sistema de reatores está representado na Figura 4.2.

A operação em modo contínuo foi escolhida para evitar o acúmulo de subprodutos dos processos aplicados ao longo de vários ciclos. O estudo da desnitrificação autotrófica no reator R3 constituiu o objetivo fundamental dos estudos para esta etapa (SOUZA, 2011).

Efluentes de reatores anaeróbios apresentam fração orgânica residual de difícil degradação, de composição complexa e ainda pouco caracterizada, inviabilizando sua simulação por meio de efluentes sintéticos. Desta forma, os reatores R1 e R2 foram aplicados como unidades auxiliares, possibilitando que a alimentação de R3 fosse

realizada com efluente produzido biologicamente e contivesse todos os residuais inerentes aos processos de degradação anaeróbia e de nitrificação. A mistura dos efluentes de R1 e R2 forneceu o par doador/receptor de elétrons a R3: sulfeto e nitrato, os dois substratos fundamentais ao processo, segundo Souza (2011).

Figura 4.2 – Esquema geral do sistema de reatores em escala de bancada para tratamento de esgoto sanitário sintético: (1) esgoto sanitário sintético; (2) bomba para alimentação de R1; (3) reator UASB para digestão anaeróbia (R1); (4) esgoto doméstico pré-tratado anaerobiamente; (5) bomba para alimentação de R2; (6) reator nitricante (R2); (7) compressor de ar; (8) efluente nitricado; (9) mistura dos efluentes dos reatores R1 e R2; (10) bomba para alimentação de R3; (11) reator UASB para desnitrificação (R3); (12) bomba de recirculação; (13) efluente final. As amostras para os ensaios microbiológicos e biomoleculares deste estudo foram coletadas do reator R3, no ponto indicado pelo retângulo. (Fonte: Souza, 2011).

O efluente de R1 apresentou composição típica de reatores anaeróbios aplicados ao tratamento secundário de esgotos sanitários, sendo principalmente constituído por

nitrogênio amoniacal, sulfeto e residual de matéria orgânica. Quando aplicado a reatores nitrificantes como R2, tem-se a degradação do residual orgânico, a oxidação de sulfeto a sulfato e de nitrogênio amoniacal a nitrato (SOUZA, 2011).

Deste modo, para a obtenção de efluente contendo o par doador/receptor de elétrons para viabilizar a ocorrência da desnitrificação autotrófica em R3, procedeu-se à mistura de efluente nitrificado proveniente de R2 com o efluente não nitrificado, diretamente proveniente de R1. Portanto, isso justifica a importância de evitar a nitrificação total do efluente de R1 para ser possível a ocorrência de desnitrificação autotrófica; caso contrário, todo o sulfeto seria oxidado a sulfato, eliminando a presença do doador de elétrons para esse processo, de acordo com Souza (2011).

4.2.1.1 Reator anaeróbio para remoção de matéria orgânica R1 (SOUZA, 2011)

As principais funções do reator R1 foram a remoção da matéria orgânica do esgoto sanitário sintético utilizado no experimento e a produção de efluente anaeróbio típico, para o qual o pós-tratamento é foco deste estudo. O tempo de retenção hidráulica reator UASB em escala de bancada foi de aproximadamente 12 horas, considerando-se o volume total do reator (SOUZA, 2011). Na Tabela 4.1 estão apresentadas as características principais deste reator. O TDH está expresso considerando-se o volume total de R1.

O reator R1 foi inoculado com lodo desnitrificante heterotrófico metanogênico, com aproximadamente 40 g STV.L^{-1} , proveniente de reator UASB utilizado no tratamento da água residuária da Avícola Dacar (Tietê – SP). O lodo foi mantido sob a forma granulada para favorecer o processo de degradação anaeróbia aplicado nessa unidade (SOUZA, 2011).

Tabela 4.1 – Características do reator contínuo em escala de bancada R1 (SOUZA, 2011).

Configuração	UASB; anaeróbio
Inóculo	Biomassa suspensa granulada
Volume	11,2 L
TDH	12 h
Função	Tratamento secundário
Alimentação	Esgoto sanitário sintético
Afluente	Matéria orgânica e sulfato
Efluente	Sulfeto, nitrogênio amoniacal e residual orgânico

A alimentação do reator R1 foi realizada com esgoto sanitário sintético segundo Torres (1992), modificada por Sarti et al. (2001). Os componentes desse esgoto sanitário sintético modificado estão listados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Composição do esgoto sanitário sintético para o reator R1 (SOUZA, 2011).

<i>Componentes principais</i>	
Extrato de carne (mg.L ⁻¹)	425
Sacarose (mg.L ⁻¹)	36
Amido (mg.L ⁻¹)	111
Celulose (mg.L ⁻¹)	41
Óleo de soja comercial (mL.L ⁻¹)	0,55
Detergente comercial (mL.L ⁻¹)	0,10
<i>Sais</i>	
NaCl (mg.L ⁻¹)	250
MgCl ₂ .6H ₂ O (mg.L ⁻¹)	7
CaCl ₂ .2H ₂ O (mg.L ⁻¹)	5
KH ₂ PO ₄ (mg.L ⁻¹)	23
K ₂ HPO ₄ (mg.L ⁻¹)	6
Na ₂ SO ₄ (mg.L ⁻¹)	148
NaHCO ₃ (mg.L ⁻¹)	200
<i>Micronutrientes</i>	
Ácido nitrilotriacético (NTA) (mg.L ⁻¹)	12,800
FeCl ₃ .6H ₂ O (mg.L ⁻¹)	1,350
MnCl ₂ .4H ₂ O (mg.L ⁻¹)	0,100
CoCl ₂ .6H ₂ O (mg.L ⁻¹)	0,024
CaCl ₂ .2H ₂ O (mg.L ⁻¹)	0,100
ZnCl ₂ (mg.L ⁻¹)	0,100
CuCl ₂ .2H ₂ O (mg.L ⁻¹)	0,025
H ₃ BO ₃ (mg.L ⁻¹)	0,010
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (mg.L ⁻¹)	0,024
NaCl (mg.L ⁻¹)	1,000
Na ₂ SeO ₃ .H ₂ O (mg.L ⁻¹)	0,026
NiCl ₂ .6H ₂ O (mg.L ⁻¹)	0,120

Esta composição contém substâncias de fácil e difícil degradação, além de compostos como óleo e detergente, que contribuem para a complexidade da água residuária, simulando a diversidade de compostos presentes em esgotos sanitários (TORRES, 1992 *apud* SARTI et al., 2001). A DQO média foi de 500 mg.L^{-1} (SOUZA, 2011).

A adição de aproximadamente $100 \text{ mg de SO}_4^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$ sob a forma de sulfato de sódio (Na_2SO_4) possibilitou a produção de sulfeto no reator R1, utilizado como doador de elétrons no reator R3. Tal concentração de sulfato foi compatível com aquelas verificadas em esgotos sanitários e produziria aproximadamente $30 \text{ mg S}^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$, concentração semelhante à estequiométrica, considerando-se redução total de sulfato a sulfeto em R1 (SOUZA, 2011).

4.2.1.2 Reator aeróbio para nitrificação R2 (SOUZA, 2011)

O reator aeróbio de fluxo ascendente R2 com biomassa nitrificante imobilizada em leito móvel foi empregado para a nitrificação do efluente de R1. O reator cilíndrico, construído em acrílico, com volume total de 2,70 L, foi operado com TDH de 12 horas, considerando-se o volume total do reator. Foram utilizados cubos de espuma de poliuretano envoltos por material plástico como material suporte. A aeração do sistema foi realizada por meio de pedra porosa localizada na base do reator ligada uma bomba de ar para aquários. O efluente foi coletado a partir da parte superior da unidade (SOUZA, 2011).

A configuração desta unidade foi elaborada pelo mesmo autor para garantir máxima eficiência de nitrificação, de modo estável e permanente, razões para justificar a opção por elevado TDH e grandes quantidades de material suporte, considerando-se a carga de nitrogênio aplicada (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Características do reator contínuo em escala de bancada R2 (SOUZA, 2011).

Configuração	Fluxo ascendente e leito móvel; aeróbio
Inóculo	Biomassa imobilizada
Volume	2,70 L
TDH	12 h
Função	Nitrificação
Alimentação	Efluente de R1
Afluente	Sulfeto, nitrogênio amoniacal e residual orgânico
Efluente	Sulfato e nitrato

O inóculo do reator nitrificante R2 foi obtido de sistema de lodos ativados para tratamento de esgoto sanitário da *Wolkswagen* (São Carlos – SP), conhecido por sua atividade nitrificante. O material suporte empregado consistiu de cubos de espuma de poliuretano de 1 cm de aresta encaixados em pequenos cilindros plásticos de 1 cm de diâmetro e 1 cm de altura (SOUZA, 2011).

A alimentação foi realizada por bomba de diafragma, através de entrada localizada na parte inferior do reator. Inicialmente, o reator R2 foi alimentado com meio sintético seletivo para micro-organismos nitrificantes, adaptado de Iamamoto (2006), cuja composição está apresentada na Tabela 4.4 (SOUZA, 2011).

Após a estabilização da nitrificação com meio sintético, R2 passou a ser alimentado com efluente proveniente de R1. Foi mantida a adição de NaHCO_3 (400 mg.L^{-1}) durante toda a operação desta unidade nitrificante, para fornecimento de carbono inorgânico e controle de pH na nitrificação (SOUZA, 2011).

Tabela 4.4 – Composição do meio sintético para nitrificação utilizado (Souza, 2011, adaptado de Iamamoto, 2006).

<i>Componente</i>	<i>Concentração (mg.L⁻¹)</i>
<i>Componentes principais</i>	
NH ₄ Cl	153
NaHCO ₃	600
MgSO ₄ .7H ₂ O	20
CaCl ₂ .2H ₂ O	4
KH ₂ PO ₄	10
K ₂ HPO ₄	10
<i>Micronutrientes</i>	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,200
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,250
KMnO ₄	0,050
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,050
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,800
NiSO ₄ .6H ₂ O	0,050
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,200

4.2.1.3 Reator anóxico para desnitrificação R3 (SOUZA, 2011)

O reator desnitrificante R3 foi construído em acrílico, no formato de UASB cilíndrico, com volume total de 3,77 L e a operação realizada com TDH de 24 horas. A escolha de reator UASB para o estudo do processo é justificada pela eficiência com que retém a biomassa em suspensão, uma vez que seu crescimento é lento em condições autotróficas e perdas excessivas de biomassa poderiam prejudicar o experimento (SOUZA, 2011). Suas principais características estão expressas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Características do reator contínuo em escala de bancada R3 (SOUZA, 2011).

Configuração	UASB; anóxico
Inóculo	Biomassa suspensa fragmentada
Volume	3,77 L
TDH	24 h
Função	Desnitrificação
Alimentação	Mistura: Efluente de R1 + Efluente de R2
Afluente	Sulfeto, sulfato, nitrogênio amoniacal, nitrato e residual orgânico
Efluente	Enxofre elementar ou sulfato, nitrogênio amoniacal

O inóculo do reator R3 foi o mesmo utilizado para o reator R1, anteriormente descrito, fragmentado em liquidificador para a destruição dos grânulos e favorecimento do crescimento dos micro-organismos de interesse. O reator desnitrificante R3 foi submetido a sete condições, determinadas em função da alimentação (mistura em proporções variáveis dos efluentes dos reatores R1 e R2, já misturados em reservatório), aplicadas pelo pesquisador Eng. Dr. Theo Syrto Octavio de Souza. A alimentação foi realizada por meio de bomba peristáltica, com entrada de afluente pela parte inferior do reator e saída de efluente pela parte superior, após passagem por separador trifásico de vidro em formato cônico (SOUZA, 2011).

Dentre tais variações na alimentação, foram estudadas no presente trabalho as proporções de 40% de efluente nitrificado (proveniente de R2) e de 60% de efluente não nitrificado (proveniente de R1) nas condições C4, C5 e C7; adição de sulfeto nas condições C4 e C7; ausência de sulfeto na condição C5 e adição de NaHCO_3 como fonte de alcalinidade (condições C4 e C5). As condições a que o reator R3 foi submetido e aqui avaliadas estão apresentadas na Tabela 4.6.

Foi necessária a adição de sulfeto de sódio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) para correção da concentração de sulfeto adequada a cada proporção de mistura dos efluentes de R1 e R2. O pesquisador Eng. Dr. Souza constatou que o sulfeto produzido no reator

R1 se volatilizava ou oxidava já no reservatório de coleta, de modo que, ao preparar a alimentação para R3, este composto já não era detectado. Assim, partindo-se da concentração de sulfeto teórica prevista para o efluente de R1 (cerca de 30 mg.L^{-1}) foi calculada a concentração final de sulfeto necessária para a correção ($18 \text{ mg S}^{2-}.\text{L}^{-1}$), conforme visto na Tabela 4.6 (SOUZA, 2011).

Tabela 4.6 – Condições estudadas neste trabalho para o reator R3 (SOUZA, 2011).

Condição	Efluente nitrificado (R2)	Efluente não nitrificado (R1)	NaHCO_3	Sulfeto na mistura	Tempo de operação (dias)
C4	40%	60%	2000 mg.L^{-1}	$18 \text{ mg S}^{2-}.\text{L}^{-1}$	25
C5	40%	60%	2000 mg.L^{-1}	Não	30
C7	40%	60%	Não	$18 \text{ mg S}^{2-}.\text{L}^{-1}$	38

A condição C5, em que não foi adicionado sulfeto, teve por objetivo verificar se a desnitrificação era realmente autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons e para a identificação de outros processos de remoção de nitrogênio que pudessem estar ocorrendo paralelamente no sistema. O efeito da concentração da fonte de alcalinidade adicionada para controle de pH e fornecimento de carbono inorgânico aos micro-organismos foi avaliado na condição C7 (Tabela 4.6). Desta forma, não houve adição de NaHCO_3 nesta condição: a alcalinidade foi proveniente apenas dos efluentes de R1 e R2, de acordo com Souza (2011).

4.3 Sistemas de reatores em escala piloto (SOUZA, 2011)

A concepção deste sistema pelo Eng. Dr. Theo S. O. de Souza teve como base a possibilidade de aproveitamento total do sulfeto gerado no compartimento anaeróbio

como doador de elétrons para a desnitrificação, bem como no uso de fontes alternativas de doadores de elétrons.

Para isso, foram operados dois reatores de fluxo ascendente: um reator compartimentado anaeróbio/anóxico para remoção da matéria orgânica e desnitrificação e um reator aeróbio nitrificante, com o objetivo de aplicação do processo de desnitrificação autotrófica ao pós-tratamento de reatores anaeróbios utilizados no tratamento de esgoto sanitário. Tal água residuária foi proveniente de emissário localizado próximo ao Edifício da Engenharia Ambiental, na Área II do Campus da USP, em São Carlos – SP, que transporta esgoto sanitário municipal tipicamente doméstico. Foi construído edifício anexo próximo ao emissário para viabilizar sua utilização nos trabalhos do referido Grupo (SOUZA, 2011). O esquema geral deste sistema de reatores está representado na Figura 4.3.

Ao início da operação do sistema, os reatores passaram por um período de autoinoculação e adaptação de aproximadamente 75 dias. O processo de digestão anaeróbia no compartimento inferior de RA foi estabelecido com sucesso aos 60 dias de operação, produzindo efluente com características tipicamente anaeróbias. O desenvolvimento de biomassa anaeróbia nos compartimentos inferior e superior foi constatado visualmente por meio da coloração escura do material suporte coletado ao final do período de adaptação de RA. Desta forma, o processo de autoinoculação ocorreu com sucesso para ambos os compartimentos e o material suporte empregado favoreceu a retenção da biomassa. O reator aeróbio nitrificante RB foi alimentado com parcela da vazão efluente do compartimento inferior de RA (SOUZA, 2011).

Figura 4.3 – Esquema geral do sistema de reatores em escala piloto para tratamento de esgoto sanitário real. RA: reator principal, compartimentado e de fluxo ascendente; RB: reator aeróbio, de fluxo ascendente, para promover a nitrificação de parcela da vazão efluente do compartimento inferior de RA bombeada para RB; (1) bomba para alimentação de RA; (2) câmara inferior de RA, destinada à digestão anaeróbia do esgoto sanitário afluente; (3) câmara intermediária de RA; (4) câmara superior de RA, destinada à desnitrificação; (5) separação do biogás; (6) bomba para alimentação de RB; (7) difusor de ar; (8) compressor de ar; (9) câmara nitrificante de RB. Foram coletadas as amostras para ensaios microbiológicos e biomoleculares do presente estudo a partir de (2) e (4). As medidas estão em centímetros. (Fonte: Souza, 2011).

Foram estudadas três condições distintas para a alimentação do reator desnitrificante em escala piloto (descritas abaixo, conforme Tabela 4.7), para as quais foram coletadas amostras para os ensaios de quantificação pela técnica de NMP e posterior aplicação de métodos de Biologia Molecular, conforme descrição detalhada no item 4.4.

Tabela 4.7 – Condições estudadas para o reator desnitrificante em escala piloto.

Condição Operacional	Fonte de Alimentação	Efluente nitrificado (%)	Efluente não nitrificado (%)	Tempo de operação (dias)
C1	Efluente anaeróbio	0	100	45
C2	Efluente anaeróbio + efluente nitrificado	20 – 30	70 – 80	30
C3	Efluente anaeróbio + efluente nitrificado	40 – 60	40 – 60	30

O reator desnitrificante foi alimentado somente com efluente anaeróbio não nitrificado na condição C1 durante aproximadamente 45 dias. Na condição seguinte, C2, a proporção de efluente nitrificado e não nitrificado para a alimentação do reator foi de 20 – 30% e 70 – 80%, respectivamente. Na última condição estudada, C3, foi estabelecida a proporção equivalente de efluente nitrificado e não nitrificado (entre 40 e 60%). As condições C2 e C3 tiveram duração de 30 dias (SOUZA, 2011).

De acordo com Souza (2011), é importante ressaltar que as proporções especificadas na Tabela 4.7 constituíram as condições operacionais impostas ao reator. Portanto, as fontes de alimentação expressas são teóricas, por não ter sido possível determinar na prática onde aconteciam as misturas de efluentes dentro do reator e, conseqüentemente, assegurar que houvesse essa mesma proporção no efluente da zona em que foram coletadas as amostras.

4.4 Caracterização da biomassa enriquecida nos reatores

Ao término de cada condição operacional dos reatores, foi realizada a coleta aleatória, em triplicatas (amostras compostas) das biomassas de suas câmaras desnitrificantes. Espumas de poliuretano foram retiradas aleatoriamente do interior dos reatores, removidas de suas estruturas-suporte de polietileno e transferidas para béquer contendo q.s.p. 50 mL de Tampão PBS 1x (137 mM de NaCl; 2,6 mM de KCl; 1,7 mM

de KH_2PO_4 ; pH 7,4) (SAMBROOK et al., 2001). Foram preparadas três amostras compostas (triplicatas) para cada condição estudada, a partir de três diferentes conjuntos de espumas coletados. Para o reator desnitrificante em escala de bancada R3, cada triplicata foi produzida a partir da lavagem de 15 cubos de espumas em tampão PBS 1x; para o reator do sistema piloto, foram utilizadas 3 espumas para cada triplicata.

A preparação das amostras para o estudo da diversidade bacteriana dos reatores foi realizada conforme os procedimentos descritos a seguir. Os sólidos foram desprendidos das matrizes de poliuretano com o auxílio de um bastão de vidro e o líquido turvo resultante foi centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Os sedimentados obtidos foram lavados com 5 mL de Tampão PBS 1x e novamente centrifugados. Os sobrenadantes foram descartados. Este procedimento de lavagem seguida de centrifugação foi repetido por mais duas vezes. Os sedimentados lavados com tampão foram imediatamente armazenados a -20°C.

A preparação de inóculos para os ensaios de quantificação e estudo da comunidade microbiana dos reatores consistiu no desprendimento dos sólidos das espumas com o auxílio de um bastão de vidro. Foram utilizadas alíquotas de 1,0 mL retiradas do líquido turvo resultante para iniciar as diluições seriadas em solução fosfatada no início dos ensaios de NMP.

4.5 Diversidade morfológica das comunidades microbianas encontradas

A diversidade morfológica presente nas amostras de lodo dos reatores foi examinada por meio de microscopia óptica comum. O microscópio utilizado foi um *Olympus BX-60*, acoplado a câmera para captura de imagens (*Evolution QE, Media Cybernetics Inc., USA*). As imagens foram processadas utilizando o *software Image Pro-Plus 4*.

4.6 Estudo da diversidade bacteriana dos reatores

As populações bacterianas presentes nos reatores foram caracterizadas qualitativamente por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*, SAIKI et al., 1986) seguida de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), a partir das amostras de biomassa coletadas à conclusão dos períodos para cada condição de operação dos reatores.

4.6.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico total das amostras coletadas dos reatores foi extraído utilizando método direto utilizando fenol/clorofórmio/tampão PBS 1x (1: 1: 1 v/v) e pérolas de vidro, de acordo com protocolo descrito por Griffiths et al. (2000), adaptado para amostras de lodo de reatores anaeróbios. As amostras foram tomadas aleatoriamente, em triplicata e o lodo foi desprendido das matrizes de espuma por meio de lavagem em 50 mL de Tampão PBS 1x. As alíquotas de 50 mL foram centrifugadas em tubos com capacidade de 15 mL até a obtenção de aproximadamente 0,5 g de sedimentado por amostra.

As amostras foram lavadas com 5,0 mL de Tampão PBS 1x com o auxílio de vórtex e centrifugadas a 6000 rpm, por 10 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os tubos acondicionados em gelo. Foram então adicionados 0,5 g de perólas de vidro, 1,0 mL de tampão PBS 1X, 1,0 mL de fenol tamponado e 1,0 mL de clorofórmio. Esses conteúdos foram conduzidos a agitação em vórtex por 60 segundos e centrifugados a 6000 rpm, por 10 min, a 4°C.

Foram transferidos 800 µL de sobrenadante para microtubos de 2,0 mL de capacidade aos quais foram acrescentados 800 µL de fenol tamponado. Essas misturas

foram emulsionadas em vórtex durante 3 segundos e centrifugadas a 6000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. Foram transferidos 600 µL de sobrenadante para novos microtubos de 2,0 mL de capacidade e acrescidos 600 µL de fenol tamponado a cada um, novamente emulsionados os seus conteúdos em vórtex durante 3 segundos e centrifugados a 6000 rpm, por 10 minutos, a 4°C.

Foram transferidos 500 µL do sobrenadante para novos microtubos de 2,0 mL de capacidade e adicionados 500 µL de clorofórmio. As misturas foram conduzidas ao vórtex por 3 segundos para formar emulsão, centrifugadas a 6000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. Foram transferidos 300 µL do sobrenadante para novos microtubos (capacidade 1,5 mL) e adicionados 300 µL de clorofórmio. As misturas foram conduzidas ao vórtex por 3 segundos para formar emulsão, centrifugadas a 6000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. Foram transferidos 100 µL de sobrenadante para novos microtubos (capacidade 1,5mL) e armazenados a -20°C. A qualidade e a pureza de DNA extraído foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito abaixo (item 4.6.3).

4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os fragmentos parciais de DNAr 16S das amostras foram amplificados utilizando *primers* universais para o Domínio Bacteria. *Primers* altamente específicos foram empregados para PCR específicas. A Tabela 4.8 apresenta a lista de todos os *primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para esta pesquisa, associando-os a cada etapa de análise de biologia molecular em que foram utilizados.

Tabela 4.8 – Conjunto de todos os *primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para esta pesquisa.

Análise	Primer	Posição em <i>E. coli</i>	Sequência (5'– 3')	Especificidade	Referência
PCR/DGGE	968F	968 – 984	AACCGCGAAGAACCTTAC	Universal	NIELSEN et al. (1999)
	1392R	1406 – 1392	AACGGGCGGTGTGTAC	Universal	
	GC clamp	–	CGCGGCCCGGGGCGCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGG		MUYZER et al. (1995)
PCR específicas	OST1F	663 – 686	TCAGATGTGAAATCCAATGGCTCA	<i>Thiomicrospira</i>	HÖFLE et al. (2005)
	OST1R	825 – 803	CTTAGCGTCAGTTATGTTCCAGG	<i>Thiomicrospira</i>	
	1492R	1510 – 1492	GGTTACCTTGTTACGACTT	Universal	
	EUB8F	8 – 27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Eubacteria	LANE (1991)
	S-De-F	–	CTAGTCGTCGTGATGCTTGTCATT	<i>S. denitrificans</i>	ZHANG et al. (2009)
	T-De-F	–	AAACGGTACGCGCTAACA	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	

T-De-R		—	TTGCTTAATAATCCGCCTG	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	
Clonagem	27 F	8 – 27	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Bacteria	LANE (1991)
	1100 R	1115 – 1100	GGG TTG CGC TCG TTG	Bacteria	
Sequenciamento	M13 F	—	GTA AAA CGA CGG CCA G	plasmídeo	MESSING (1983)
	M13 R	—	CAG GAA ACA GCT ATG AC	plasmídeo	

As reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de sequências parciais do gene RNA 16S a partir de DNA extraído das amostras de lodo dos reatores, bem como das matrizes dos géis de DGGE, foram realizadas utilizando: 0,5 µL de Taq DNA polymerase (5U/ µL); 5 µL de tampão PCR 10X; 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM); 5 µL de dNTP (2mM); 1 µL de *primer forward* 968F GC (100 pmol); 1 µL de *primer reverse* 1392R (100 pmol) e 2 µL de DNA extraído (> 100 ng de DNA). A caracterização de temperaturas e períodos utilizados na reação de amplificação em termociclador está apresentada na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Caracterização de temperaturas e períodos utilizados em termociclador para as reações de amplificação de sequências parciais do gene RNAr 16S com os *primers* universais 968F GC e 1392R.

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
7 min	45 s	45 s	1 min	10 min	∞
	x 35 ciclos				

Com o objetivo de avaliar a contribuição da desnitrificação autotrófica e identificar a presença de desnitrificantes autotróficos por meio de técnicas moleculares baseadas no DNAr 16S, foram aplicados *primers* altamente específicos combinados com *primers* universais (HÖFLE et al., 2005; ZHANG et al., 2009), a partir das mesmas amostras de DNA extraídos do lodo dos reatores, para a amplificação da sequência quase completa do gene RNAr 16S por PCR específicas.

OST1F corresponde às posições 663 – 686 de *E. coli*, enquanto o *primer reverse* OST1R às posições 803 – 825 de *E. coli*. OST1 F foi aplicado juntamente com 1492R para a obtenção da porção 3´da sequência; OST1 R foi combinado com o *primer* universal 27F para

Bacteria, de modo a obter a porção 5´da sequência (HÖFLE et al., 2005), como mostra a Figura 4.4.

Figura 4.4 – *Primers* OST1F e OST1R altamente específicos combinados com dois *primers* universais, 27F e 1492R, que foram usados para gerar sequências quase completas do gene RNAr 16S por meio de PCR específica (HÖFLE et al., 2005) para DNA extraído de todas as amostras do reator desnitrificante em escala de bancada e piloto. (Fonte: Höfle et al., 2005).

A programação empregada no termociclador para realizar as etapas de desnaturação da dupla fita de DNA molde, anelamento dos *primers* específicos e universais combinados e extensão das duplas fitas recém-sintetizadas está expressa na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Caracterização de temperaturas e períodos utilizados nas reações de amplificação utilizando os *primers* OST1F e OST1R altamente específicos combinados com os *primers* universais 27F e 1492R em termociclador.

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão	Resfriamento
95°C	94°C	59°C	72°C	72°C	4°C
15 min	30 s	40 s	50 s	10 min	∞
	x 35 ciclos				

Os *primers* S-De-F, T-De-F e T-De-R foram desenhados a partir do alinhamento de diversas sequências de DNAr 16S de *Sulfurimonas denitrificans*, *Thiomicrospira* sp. e clones não cultiváveis com maior similaridade (ZHANG et al., 2009). Reações de PCR com estes

primers específicos foram utilizadas com a finalidade de avaliar a diversidade de populações bacterianas responsáveis por acoplar a redução do nitrato com a oxidação do sulfeto presentes nas amostras coletadas dos reatores desnitrificantes estudados.

Na Tabela 4.11 está expressa a programação utilizada no termociclador para realizar as reações de amplificação com os *primers* específicos.

Tabela 4.11 – Caracterização de temperaturas e períodos utilizados em termociclador para as reações de amplificação utilizando os *primers* S-De-F/1392R para *S. denitrificans* ou T-De-F/T-De-R para *T. denitrificans*.

Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	Resfriamento
94°C	92°C	54°C	72°C	72°C	4°C
7 min	1 min	1 min	1 min	10 min	∞
	x 35 ciclos				

4.6.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da extração de DNA e da amplificação por PCR foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose. Foi utilizada a concentração de 0,8% de agarose para a verificação da qualidade dos produtos de extração de DNA e padrão de massa molecular *High DNA Mass Ladder* (1000 – 10000 pb, Invitrogen). Os produtos de amplificação por PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,4%, comparados ao padrão *Low DNA Mass Ladder* (100 – 2000 pb, Invitrogen).

4.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando o sistema *D-Code* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Os

fragmentos dos genes RNAr 16S, amplificados com *primers* para o Domínio *Bacteria* contendo GC *clamp*, foram separados por meio desta técnica segundo o protocolo de Muyzer et al. (1993) e De Bok et al. (2006).

O tampão utilizado para a corrida foi TAE 0,5 X (TAE 1X: 0,04 M Tris base; 0,02 M Acetato de sódio; 10 mM EDTA; pH ajustado para 7,4). O gel foi preparado com gradiente de 40 – 60% de uréia e formamida como agentes desnaturantes na direção de eletroforese. A solução 100% desnaturante consistiu em 40% (v/v) de formamida e 7,0 M de ureia. Foram aplicados 20 – 30 µL de produtos de PCR (aproximadamente 160 ng de DNA) em tampão apropriado para amostra de DNA, na proporção amostra/tampão de 3:1.

A corrida de DGGE foi conduzida à voltagem constante de 75 V, a 65°C, durante 16 horas. O gel foi corado com solução de brometo de etídeo e digitalizado em equipamento *Eagle Eye*™ III (*Stratagene*™) sob exposição a radiação UV (254 nm), acoplado ao computador. O *software* utilizado foi *Eagle Sight* (*Stratagene*™). A análise por meio de leitura dos padrões de bandas foi realizada com o uso do *software BioNumerics*™.

Os padrões de bandas dos géis de DGGE foram comparados pelo coeficiente de similaridade *Dice*. As matrizes de similaridade resultantes foram convertidas em dendogramas por meio do algoritmo de *clustering* UPGMA. Foi utilizado o método *Cophenetic Correlation* para calcular a correlação entre as similaridades derivadas dos dendogramas e as matrizes de similaridades, parâmetro que expressa a consistência de um *cluster*.

Após a excisão da matriz do gel de poliacrilamida, foram empregados dois métodos para a eluição do DNA retido nas matrizes dos géis de poliacrilamida de DGGE. No primeiro, os fragmentos de poliacrilamida contendo DNA foram acondicionados em microtubos estéreis, aos quais foram adicionados 100 µL de água ultrapurificada estéril. Estes conteúdos

foram armazenados a 4°C durante 24 horas para permitir a eluição do DNA retido na matriz do gel para a fase líquida.

Os fragmentos de poliacrilamida contendo DNA foram retirados dos tubos e 100 µL de etanol 100% gelado foram acrescentados, promovendo-se gentilmente a homogeneização. Os tubos foram conduzidos a centrifugação durante 10 minutos, a 4°C, a 14000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados vertendo-se os tubos sobre papel absorvente. Foram adicionados 100 µL de etanol 70% gelado, homogeneizando-se gentilmente e realizada nova centrifugação durante 10 minutos, a 4°C, a 14000 rpm.

Os sobrenadantes foram descartados como descrito acima e os tubos permaneceram abertos durante 10 horas para secagem completa. Foram acrescentados 30 µL de tampão de purificação *kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Health Care™) e a homogeneização foi realizada gentilmente. As amostras de DNA precipitado dissolvido em tampão foram armazenadas a -20°C. Para as reações de amplificação por PCR para o sequenciamento, foram utilizados 3 µL de DNA armazenado como molde.

O segundo protocolo de eluição de DNA, modificado de Ferris et al. (1996), consistiu em acondicionar os fragmentos de poliacrilamida contendo DNA em microtubos estéreis, aos quais foram adicionados 500 µL de água ultrapurificada estéril. Estes conteúdos foram armazenados a 4°C durante 10 horas para permitir a eluição do DNA retido na matriz do gel para a fase líquida. Ao término desse período, foram retiradas alíquotas de 10 µL para serem imediatamente utilizadas como DNA molde nas reações de amplificação subsequentes. Após a retirada das alíquotas, os fragmentos de poliacrilamida contendo DNA foram então removidos dos tubos e procedeu-se à precipitação do DNA com série de etanóis gelados, conforme descrito para o primeiro protocolo. A necessidade de aplicação deste protocolo encontrou justificativa a partir dos insucessos na recuperação do DNA para algumas amostras quando da aplicação do primeiro protocolo.

Os fragmentos dos genes RNAr 16S de DNA recuperados das bandas excisadas do gel de gradiente desnaturante foram amplificados utilizando o conjunto de *primers* para o Domínio *Bacteria*, 968 F (sem GC *clamp*) e 1392 R. A amplificação foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,4%. Os produtos de PCR com qualidade e concentração comprovadas foram purificados com o *kit Illustra GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Health CareTM). Os produtos purificados foram utilizados nas reações para posterior sequenciamento.

4.6.5 Clonagem de fragmentos do gene RNAr 16S

Os procedimentos para clonagem de fragmento do gene RNAr 16S foram realizados a partir do DNA extraído da amostra 19 da condição de operação C3 do reator principal RA em escala piloto. A escolha da amostra baseou-se na hipótese levantada por Souza (2011) de que a região acima do compartimento inferior de RA estava sendo exposta à mistura de efluentes nitrificado e não nitrificado. Tal mistura poderia explicar a diminuição da concentração de nitrogênio amoniacal nesse ponto de amostragem. Além disso, não foi detectado nitrato e nitrito significativamente nesse ponto e em nenhum ponto de amostragem de RA. Este fato sugere a ocorrência de desnitrificação no compartimento intermediário de RA, por problemas hidrodinâmicos inesperados, descritos por Souza (2011).

Pelos resultados obtidos para o efluente do compartimento inferior de RA, ficou evidente que, na primeira fase de operação, o líquido localizado na região imediatamente acima do compartimento inferior apresentou características de meio reduzido, ou seja, com redução de sulfato a sulfeto e valores bastante negativos de potencial de óxido-redução, enquanto que na fase seguinte predominaram características de meio oxidado, com oxidação de sulfeto a sulfato e valores neutros ou positivos de potencial de óxido-redução. Esta inversão de comportamentos pode ter sua explicação nas alterações hidrodinâmicas causadas

no compartimento intermediário de RA quando da transição entre as duas primeiras fases de operação do sistema. Foi verificado consumo de nitrogênio amoniacal no compartimento inferior de RA em todas as fases de operação (que não é comum ao processo de digestão anaeróbia). Esta mistura imprevista no compartimento intermediário pode ter redefinido, desta forma, os processos e funções de cada compartimento do sistema (SOUZA, 2011). Para contribuir ao estudo desses fenômenos, foi realizada a clonagem do fragmento do gene RNAr 16S a partir da amostra correspondente a essa fase.

As reações de amplificação foram conduzidas em volume final de 50 μL , utilizando 200 μM de dNTP, 2,5 U de DNA Taq polimerase *Recombinant* e tampão Taq polimerase (Invitrogen), 1,5 μM de cada um dos *primers* 27F e 1100R (LANE, 1991), 1 mM de MgCl_2 e aproximadamente 80 ng de produto de PCR purificado, com a seguinte programação: 94°C por 5 min; 10 ciclos de 30s a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 68°C; 39 ciclos de 30s a 94°C, 1 min a 65°C, 1 min a 68°C; 10 min a 72°C.

Os fragmentos amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em TAE (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA), conforme descrito na Seção 4.6.3. As amostras que apresentaram qualidade foram purificadas com o *kit Illustra GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (GE Health CareTM)* e submetidas à reação de adenilação, segundo os componentes expressos na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Reagentes e respectivas quantidades para reação de adenilação de produtos de PCR purificados.

Produto de PCR purificado (80 – 100 ng)	3,0 μL
Taq Polimerase (n ão Platinum)	1,0 μL
dATP 5 mM	1,0 μL
Tampão PCR 10x	1,0 μL
MgCl_2 50 mM	0,2 μL
Água ultrapurificada estéril q.s.p.	10,0 μL

As reações foram incubadas a 70°C durante 30 minutos em termociclador. Os fragmentos do gene RNAr 16S foram clonados no plasmídeo *pGEM-T Easy Vector* (Promega), vetor linear com elevado número de cópias (Figura 4.5). A escolha de vetores e cepas de *E. coli* compatíveis com o sistema de colônias azuis e brancas apresenta a vantagem da α -complementação intracistrônica para regenerar a atividade da β -galactosidase.

Figura 4.5 – Mapa do vetor *pGEM-T Easy Vector*. Modificado de Promega (2005).

Muitas cepas de *E. coli* utilizadas para a clonagem e propagação de plasmídeos contêm uma deleção cromossômica do operon *lac*, mas carregam um epissoma F' que fornece a sequência restante para codificação do gene *lacZ*. O produto do gene funcional *lacZ*, a enzima β -galactosidase, é produzido quando a informação de codificação de *lacZ* ausente no epissoma F' é fornecida por um plasmídeo.

Esta atividade é detectada pelo plaqueamento de bactérias transformadas por plasmídeos em placas contendo IPTG (isopropílico β -D-tiogalactopiranosídeo, um indutor do promotor *lac*) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo, um pigmento que produz cor azul quando hidrolisado por β -galactosidase), possibilitando a identificação de tais colônias.

Os produtos de PCR amplificados com o conjunto de *primers* 27F/1100R e posteriormente purificados e adenilados foram ligados ao vetor *pGEM-T* por meio de incubação de 50 ng de vetor, 70 ng de cada produto de PCR e 3U de T4 DNA ligase em *Rapid Ligation Buffer* 1X (30 mM de Tris-Cl pH 7,9; 10 mM de MgCl₂; 10 mM de DTT; 0,5 mM de ATP e 5% PEG) em volume total de 10 µL por reação, conforme a Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Reagentes e respectivas quantidades para reações de ligação de inserto de DNA ao vetor.

2x Rapid Ligation buffer T4 DNA ligase ^a	5,0 µL
Vector pGEM – T – easy (50 ng/µL) ^b	1,0 µL
Produto de PCR adenilado	2,0 µL
T4 DNA ligase (3 Weiss units/µL)	1,0 µL
Água ultrapurificada estéril q.s.p.	10,0 µL

^a homogeneizar o tampão de ligação no vortex antes de utilizar; ^b centrifugar antes de utilizar.

Os componentes da reação foram homogeneizados gentilmente (sem promover sucção com a pipeta). As reações foram incubadas a 4°C por 16 horas.

Ao término deste período, células competentes de *E. coli* DH10b foram retiradas do ultrafreezer (-80°C) e acondicionadas em gelo por 5 minutos. Foram transferidos 2,0 µL do produto de ligação para microtubo contendo células competentes, misturando-se cuidadosamente com a pipeta, sem utilizar a sucção. Os conteúdos foram incubados em gelo durante 20 minutos e então transferidos para banho-maria a 42°C por 50 segundos, sem agitação, seguidos de incubação em gelo durante 2 minutos.

Foram adicionados 200 µL de Meio LB – Luria Bertani (triptona 1% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v) e NaCl 0,5% (p/v), pH 7,0) a temperatura ambiente. Procedeu-se à incubação a 37°C por 1h30, com agitação de 150 rpm. Após a incubação, foram transferidos 100 µL do material transformado para cada placa de LB preparada segundo a Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Reagentes e respectivas concentrações para a preparação de Meio LB ágar acrescido de X-Gal, IPTG e ampicilina para semeadura de células transformadas com vetor.

Meio LB ágar liquefeito	50 mL
X – Gal (40 mg/mL)	64 µL
IPTG (50 mg/mL)	80 µL
Ampicilina (50 mg/mL)	30 µL
Volume final	50 mL

O meio LB ágar estéril foi liquefeito e resfriado até aproximadamente 40°C para então ser distribuído em alíquotas de 25 mL em placas de Petri descartáveis. Após a solidificação do meio nas placas (aproximadamente 30 minutos), foi realizado o esfregaço das células transformadas com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em posição invertida a 37°C durante 12 horas.

Quando o quadro de leitura do α -peptídeo é interrompido por inserção de um fragmento de DNA exógeno ou pela deleção de sequências do vector, a α -complementação não pode ocorrer e as colônias bacterianas permanecem brancas. Tal inativação do α -peptídeo permite que clones recombinantes em placas contendo X-Gal e IPTG sejam identificados por meio de diferenciação pela coloração: colônias brancas contêm o inserto (fragmento de DNA exógeno de interesse) e colônias azuis não o incorporaram.

Colônias brancas foram pinçadas das placas com o auxílio de ponteiros estéreis e utilizadas para inocular 5,0 mL de Meio LB estéril contendo 3 µL de ampicilina (50 mg/mL). As culturas cresceram sob agitação de 150 rpm, em banho a 37°C, durante 12 – 14 horas (período que corresponde ao meio da fase exponencial de crescimento para *E. coli* nas condições acima).

Após o crescimento, 2 mL de cultura foram centrifugados durante 5 minutos, a 10000 rpm e a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e o procedimento repetido para a obtenção

de maior concentração de células. Para armazenamento, os sedimentados foram suspensos em 500 µL de Tampão TE, centrifugados a 4°C por 5 minutos, tiveram os sobrenadantes desprezados e os sedimentados novamente suspensos em 100 µL de Tampão TE e estocados a -20°C. Para produzir estoques em glicerol, foram retirados 1,5 mL de sobrenadante produzido pela segunda centrifugação e os sedimentados suspensos em 500 µL de sobrenadante restante, homogeneizando-se gentilmente e adicionando-se 500 µL de glicerol 80% estéril.

Após a transformação de *E. coli*, as colônias bacterianas resultantes foram selecionadas por PCR para o vetor recombinante correto utilizando os *primers* M13F e M13R (MESSING, 1983) para amplificar o inserto. Essa seleção é facilitada pelo uso de vetores que contêm genes para resistência a antibióticos; desta forma, células contendo o vetor sobreviverão em meios suplementados com o antibiótico apropriado; neste caso, ampicilina.

4.6.6 Reação de Sequenciamento e obtenção das sequências parciais

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o *kit Big Dye Terminator* (Applied Biosystem®) com nucleotídeos marcados. Os componentes de reação e suas respectivas quantidades utilizadas foram (por amostra): 3 µL de água ultrapurificada estéril, 3 µL de *primer forward* (968F) a 10 pmol, 1µL de 5X Sequencing Buffer, 1µL de *Big Dye*, 2 µL de produto de PCR purificado, totalizando volume final de reação de 10 µL. Os tubos foram colocados em termociclador sob as condições apresentadas na Tabela 4.15.

Para a precipitação do DNA foram adicionados 40 µL de isopropanol 65% nos tubos, que foram mantidos por 15 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm a 20°C por 30 minutos e o isopropanol foi removido dos tubos por inversão.

Tabela 4.15 – Condições para as reações de sequenciamento em termociclador.

Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
35	94°C	50°C	60°C
	15 s	15s	4 min

Foram adicionados 200 µL de etanol 60% a cada precipitado e os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm a 20°C por 5 minutos. As amostras foram mantidas na ausência de luz, a temperatura ambiente, até a evaporação total do álcool (aproximadamente 12 horas). Após a secagem completa, as amostras foram armazenadas a -20°C até o tratamento com o agente desnaturante (formamida) e procedimentos subsequentes descritos a seguir.

As amostras de DNA precipitados foram suspensas em 15 µL de formamida *Hi – Di* e submetidos a choque térmico (94°C por 5 minutos e 4°C por 5 minutos) em termociclador para desnaturação do DNA. As amostras foram transferidas para tubos apropriados para o sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 310, *Applied Biosystems*®) para a leitura das sequências de nucleotídeos.

4.6.7 Análise das sequências parciais do gene RNAr 16S

As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas por meio do *software Seqman* do pacote *Lasergene DNASTar* (THOMPSON et al., 1994). As sequências de bases que apresentaram baixa qualidade (picos sobrepostos e de mesma amplitude no eletroferograma) foram removidas e as parciais escolhidas, com extensão superior a 200 pares de bases, foram comparadas às sequências de RNAr 16S de micro-organismos depositadas na base de dados do *GenBank* – NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por meio da ferramenta para alinhamento de sequências BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Os perfis de DGGE foram comparados com o uso do *software BioNumerics*TM (versão 4.0; *Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium*). Os índices de similaridade dos perfis comparados foram calculados a partir de curvas densitométricas obtidas das imagens digitalizadas dos géis pela aplicação do coeficiente de correlação *Dice*. Este coeficiente é aplicado diretamente sobre a matriz de valores densitométricos que formam o *fingerprint*. Dado que as curvas inteiras são comparadas e a pontuação subjetiva de bandas é omitida, o coeficiente é robusto e objetivo. O agrupamento dos padrões foi calculado utilizando-se o método estatístico UPGMA (*Unweighted-Pair Group Method using Arithmetic Mean*).

As análises das sequências de DNA obtidas e as buscas por homologia foram concluídas utilizando-se o algoritmo BLAST para comparar as sequências a serem consultadas contra a coleção de nucleotídeos da base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (ALTSCHUL et al., 1997). Os alinhamentos das sequências parciais do gene RNAr 16S foram realizados por meio da ferramenta *ClustalW* do programa MEGA 5.0TM (TAMURA et al., 2011).

Os alinhamentos resultantes foram manualmente verificados e corrigidos quando necessário e as posições dos nucleotídeos alinhadas sem ambiguidade foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas baseadas no gene RNAr 16S bacteriano, por meio do método *Neighbour-joining* (SAITOU; NEI, 1987), com 1000 replicatas (*bootstrap*), aplicando-se o modelo de substituição *Maximum-composite-likelihood* com deleção completa das lacunas, dentro do programa MEGA 5.0TM.

4.7 Quantificação das populações desnitrificantes dos reatores por NMP

A densidade das populações desnitrificantes viáveis foi estimada por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP), de acordo com protocolo descrito por Tiedje (1982), modificado para amostras líquidas.

Os micro-organismos desnitrificantes viáveis foram quantificados a partir de amostras de biomassa coletadas dos dois sistemas de reatores (reatores de bancada e reatores do sistema em escala piloto), de modo a verificar os efeitos das diferentes condições de operação no enriquecimento das comunidades desnitrificante e desnitrificante autotrófica.

4.7.1 Estimativa de bactérias desnitrificantes heterotróficas pela técnica do Número Mais Provável (NMP)

O meio genérico *Nutrient Broth* acrescido de nitrato na concentração de 500 mg.L⁻¹ foi utilizado para o crescimento dos micro-organismos desnitrificantes heterotróficos. Os reagentes foram pesados separadamente (4,0 g de *Nutrient Broth* e 0,3425 g de NaNO₃) e dissolvidos em água ultra purificada previamente aquecida em quantidade suficiente para completar o volume para 500 mL.

Alíquotas de 4,5 mL deste meio foram distribuídas em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL. Os tubos foram fechados com tampas de borracha e esterilizados em autoclave (a 120°C, sob 1 atm, durante 20 minutos). Após a esterilização, os tubos foram completamente vedados em ambiente asséptico (próximo à chama do bico de Bunsen) e mantidos à temperatura ambiente e na ausência de luz até o momento da inoculação.

A água de diluição para as alíquotas de amostra de cada condição estudada foi preparada a partir de duas soluções estoque, conforme descrito na Tabela 4.16, distribuídas em tubos de ensaio tampados com algodão e gaze e esterilizados em autoclave (a 120°C, sob 1 atm, durante 20 minutos).

As diluições foram realizadas em ambiente asséptico tomando-se 1,0 mL de amostra previamente homogeneizada e adicionando-o em 9,0 mL de água de diluição, repetindo-se este procedimento até que fossem obtidas todas as diluições desejadas (de -1 a -20).

Tabela 4.16 – Composição da água fosfatada para a diluição do inóculo no ensaio de quantificação de bactérias desnitrificantes heterotróficas.

<i>Água de Diluição</i>	
Solução estoque K_2HPO_4 0,2 M	1,0 mL
Solução estoque KH_2PO_4 0,2 M	0,25 mL

Em seguida, foram inoculados 0,5 mL de cada amostra correspondente a cada uma das diluições em meio de cultivo (4,5 mL), em cinco tubos por diluição, utilizando-se seringas e agulhas estéreis. Ao término das inoculações, os tubos foram protegidos da luz e acondicionados em estufa com temperatura controlada ($30^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$) durante 14 dias.

Após o período de incubação, os cinco tubos correspondentes a cada diluição foram testados para determinação da presença de nitrato por meio de reação com difenilamida ácida. Foram transferidos 0,4 mL de cada tubo para novos tubos de ensaio estéreis com capacidade para 5,0 mL. A eles foram adicionadas duas a três gotas da solução de difenilamina em ácido sulfúrico concentrado (200 mg de $(C_6H_5)_2NH$ em 100 mL de H_2SO_4).

A difenilamida oxidada na presença de nitrito ou nitrato é convertida em difenilbenzidina e, posteriormente, em um sal de coloração azul, denominado quinoidiamonium. A ausência de coloração após a rápida reação da amostra com a solução de difenilamina indica o consumo de nitrato e possível presença de bactérias desnitrificantes (resultado positivo). A coloração azul indica a presença de nitrato na amostra e possível ausência de bactérias desnitrificantes (resultado negativo).

A estimativa do NMP de bactérias desnitrificantes heterotróficas foi realizada por meio da combinação de resultados positivos (consumo de nitrato) e negativos, de acordo com a Tabela Padrão de Probabilidades da APHA-AWWA-WEF (2005), com intervalo de confiança de 95%.

Para uma dada combinação de resultados, esta tabela traz um valor que é aplicado na Equação 4.1. Desta forma, as estimativas podem ser expressas em NMP/100 mL.

$$\text{NMP/100 mL} = (a \times 10) / (10^b) \quad (\text{Equação 4.1})$$

Em que a é o valor da Tabela de Probabilidade para a combinação de tubos positivados e b é a ordem da diluição da combinação de tubos positivados mais diluída.

4.7.2 Estimativa de bactérias desnitrificantes autotróficas pela técnica do Número Mais Provável (NMP)

Os ensaios foram realizados em frascos de antibiótico (30 mL), a 30°C, sem agitação, com 20 diluições seriais em quintuplicata. Foi escolhido o meio de cultura denominado CSB (*Coleville Synthetic Brine*, GEVERTZ et al., 2000), modificado para torná-lo seletivo para bactérias redutoras de nitrato quimiolitotróficas que oxidam sulfeto (ECKFORD; FEDORAK, 2002). A determinação da presença dos micro-organismos desnitrificantes autotróficos foi feita pela determinação do consumo do composto nitrogenado.

A solução de componentes principais, a de elementos-traço e a de micronutrientes, expressas na Tabela 4.16, foram preparadas separadamente. Para a composição de 1,0 L de meio CSB modificado, foram adicionados 50 mL de solução de elementos-traço (TELANG et al., 1999) e 10 mL de solução de micronutrientes (ECKFORD; FEDORAK, 2002).

O meio CSB preparado conforme descrito abaixo foi esterilizado por meio de filtração a vácuo com sistema Millipore™. Aliquotas de 9,0 mL foram distribuídas nos frascos de antibiótico de 30 mL de capacidade, previamente esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm, durante 20 minutos. Foram submetidos à troca de atmosfera com mistura padrão dos gases N₂/CO₂ (70:30%) para expulsão do oxigênio e manutenção do pH entre 6,8 e 7,5. Os frascos foram imediatamente fechados com tampas de butila e lacres de alumínio.

Tabela 4.17 – Composição do Meio CSB modificado.

<i>Componente</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>
<i>Componentes principais</i>	
KH ₂ PO ₄	0,027
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,680
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,240
NH ₄ Cl	0,020
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,130
NaHCO ₃	1,900
KNO ₃	1,000
Resazurin	0,001
<i>Elementos-traço</i>	
Ácido nitrilotriacético (NTA)	2,00
FeCl ₃ (0,29 g.L ⁻¹)	0,02 L
CaSO ₄ .2H ₂ O	1,20
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,00
NaCl	0,16
Na ₂ HPO ₄	1,40
KH ₂ PO ₄	0,72
<i>Micronutrientes</i>	
H ₂ SO ₄	0,005 L
MnSO ₄ .H ₂ O	2,280 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,500 g
H ₃ BO ₃	0,500 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,045 g

A solução de sulfeto de sódio (Na₂S. 9H₂O) 0,1 M foi preparada como solução estoque estéril e adicionada em alíquotas de 0,25 mL em cada frasco, de modo a obter a concentração final de 2,5 mM para o volume reacional final de 10,0 mL (ECKFORD & FEDORAK, 2002). A concentração de nitrogênio sob a forma de nitrato utilizada na preparação do meio CSB modificado corresponde a 138,48 mg N-NO₃⁻.L⁻¹.

A leitura das quintuplicatas foi realizada após o período de incubação de 30 dias. A determinação do nitrato foi efetuada pela adição de solução de difenilamina ácida (descrita anteriormente) às alíquotas de 1,0 mL de cultura provenientes de cada um dos cinco tubos de cada diluição.

O cálculo do NMP para bactérias desnitrificantes autotróficas foi realizado utilizando a Tabela Padrão de Probabilidades (APHA-AWWA-WEF, 2005), com intervalo de confiança de 95%, utilizando Equação 4.2 (conforme já descrito anteriormente no subitem 4.7.1).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diversidade Bacteriana dos Reatores Desnitrificantes em Escalas de Bancada e Piloto

As técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foram aplicadas às amostras coletadas dos reatores em estudo para a avaliação da diversidade de populações bacterianas encontradas nos sistemas, sob distintas condições de operação, por meio da análise dos padrões de bandas de DGGE e da identificação de filotipos.

Os fragmentos do gene RNAr 16S das populações bacterianas presentes nos reatores foram amplificados utilizando *primers* específicos para o Domínio *Bacteria* e separados por meio de DGGE (Figuras 5.1 e 5.8).

Foram excisados 49 fragmentos de poliacrilamida dos géis de DGGE, entre os quais sete (7c, 13a, 14a, 14e, 15b, 15c e 17b, Figuras 5.1 e 5.8) tiveram o DNA contido em suas matrizes recuperado e amplificado por PCR utilizando os *primers* 968F sem GC *clamp* e 1392R para subsequente reação de sequenciamento. Os fragmentos do gene RNAr 16S amplificados foram sequenciados e as reações bem sucedidas produziram sequências relacionadas aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Clostridium*, *Cupriavidus* e *Ralstonia*.

As referências e demais informações sobre as associações realizadas após a comparação com as sequências de genes RNAr 16S bacterianos depositadas na base de dados do *GenBank* estão contidas nas Tabelas 5.1 e 5.2. Os perfis de bandas analisados por meio do *software BioNumerics*TM estão apresentados nas Figuras 5.2 e 5.9.

5.1.1 Comunidade bacteriana estabelecida no reator desnitrificante R3 em escala de bancada

Os perfis de bandas para os fragmentos do gene rRNA 16S amplificados por PCR utilizando *primers* para o Domínio *Bacteria* e separados por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40 – 60%) estão apresentados na Figura 5.1.

As amostras provenientes de biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada R3, alimentado com 40% de efluente nitrificado e 60% de efluente não nitrificado, estão identificadas de acordo com as condições de operação do reator: Condição C4 (amostra 13), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e de 18 mg S²⁻.L⁻¹; Condição C5 (amostra 14), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e sem adição de S²⁻; Condição C7 (amostra 15), sem adição de NaHCO₃ e com adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹.

Foram excisados todos os fragmentos de poliacrilamida apresentando bandas que podem ser visualizados na Figura 5.1. No entanto, as reações de sequenciamento produziram sequências com qualidade apenas para as bandas identificadas pelos retângulos e caracteres alfanuméricos.

Verificou-se que algumas populações presentes nas amostras das coletas subsequentes à primeira amostragem não foram detectadas por DGGE (Figura 5.1). Esta constatação pode indicar o favorecimento de populações desnitrificantes autotróficas sobre as heterotróficas obrigatórias, dada a escassez de matéria orgânica que caracterizou as condições em estudo para este reator. A amostra 16 corresponde a enriquecimento de cultura desnitrificante heterotrófica, realizado a partir de inoculação de Meio Nutriente acrescido de nitrato (conforme descrito no item 4.7.1) com alíquota de lodo da amostra 15.

Figura 5.1 – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40 – 60%) dos fragmentos do gene RNAr 16S amplificados por PCR utilizando *primers* para o Domínio *Bacteria*. Amostras de biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada alimentado com 40% de efluente nitrificado e 60% de efluente não nitrificado: amostra 13 (condição C4), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e de 18 mg S²⁻.L⁻¹; amostra 14 (condição C5), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e sem adição de S²⁻; amostra 15 (condição C7), sem adição de NaHCO₃ e com adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹. As bandas identificadas pelos retângulos representam aquelas para as quais as reações de sequenciamento foram bem sucedidas.

A partir dos resultados das análises da imagem do gel de DDGE por meio do *software BioNumerics*TM (Figura 5.2), foi possível inferir ter havido seleção de populações bacterianas detectadas pela técnica de PCR/DGGE sucessivamente da condição C4 para a C7 e, por consequência, o número de bandas foi reduzido ao longo do período de operação do reator desnitrificante em escala de bancada.

Figura 5.2 – Análise densitométrica dos perfis de bandas do gel de DGGE para as amostras coletadas do reator desnitrificante em escala de bancada nas condições operacionais C4, C5 e C7. (a) Identificação das bandas no gel de gradiente desnaturante e dendograma associado. (b) Dendograma e sua respectiva matriz de similaridade. Os padrões de bandas do gel de DGGE foram comparados pelo coeficiente de similaridade *Dice*. A matriz de similaridade resultante foi convertida em dendograma por meio do algoritmo de *clustering* UPGMA e a correlação entre as similaridades derivadas do dendograma e a matriz de similaridade foi calculada pelo método *Cophenetic Correlation*.

As amostras 13 e 14 apresentaram 78,8% de similaridade entre seus perfis de bandas. As condições associadas a tais perfis diferiram apenas quanto à adição de sulfeto na condição C4, pH 8,3 (amostra 13), não adicionado na condição subsequente, com valor de pH 8,2 (amostra 14). A banda em posição superior no gel, de forte intensidade e comum aos dois perfis (banda 13a) foi sequenciada e identificada como *Clostridium sulfidigenes* (Tabela 5.1).

A supressão da adição de alcalinidade reduziu a similaridade em 30% entre os perfis para as amostras 13 (com adição de sulfeto e de alcalinidade, pH 8,3) e 15 (com adição de sulfeto e sem adição de alcalinidade, pH 8,0).

As amostras 15 e 16 apresentaram 78,6% de similaridade entre si. O enriquecimento da cultura desnitrificante heterotrófica para a amostra 16 foi responsável por mais de 25% de modificação na composição da comunidade microbiana, comparada ao seu inóculo (amostra 15), após 30 dias de crescimento, indicando o favorecimento ainda incipiente de populações redutoras de nitrato.

A Tabela 5.1 apresenta a identificação das sequências parciais de genes RNAr 16S obtidas a partir dos fragmentos de poliacrilamida excisados do gel de DGGE de amostras do reator desnitrificante em escala de bancada, amplificadas com *primers* para o Domínio *Bacteria*, comparadas com sequências depositadas na base de dados do *GenBank*, com suas respectivas porcentagens de similaridade.

Tabela 5.1 – Identificação filogenética das sequências parciais de genes RNAr 16S obtidas a partir do gel de DGGE das amostras do reator desnitrificante em escala de bancada, amplificadas com *primers* para o Domínio *Bacteria*, comparadas com sequências depositadas na base de dados do *GenBank*.

Amostra	Taxonomia	Nº de acesso	Similaridade	Referência
13 ^a	<i>Clostridium sulfidigenes</i>	GU329908.1	99%	Maity et al. (2009)
14 ^a	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ588844.1	100%	Zhang & Margesin (2010)
14e	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	HQ658767.1	100%	Zahid et al. (2010)
15b	<i>Aeromonas hydrophila</i>	GU296111.1	99%	Li & Nie (2009)
15c	<i>Aeromonas aquariorum</i>	EU085557.2	100%	Martinez-Murcia et al. (2008)

A amostra 13 corresponde à biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada R3, ao final do período de operação de 30 dias sob a condição de alimentação na proporção de 40% de efluente nitrificado (proveniente do reator R2) e 60% de efluente não nitrificado

(proveniente do reator R1), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e correção da concentração de sulfeto na alimentação por meio da adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹.

Na Figura 5.3, verifica-se 99% de identidade entre a sequência de nucleotídeos obtida da amostra 13a do reator desnitrificante R3 e a sequência depositada no *GenBank* para o gene RNAr 16S da bactéria *Clostridium sulfidigenes*. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

```
>|gb|GU329908.1| Clostridium sulfidigenes strain BL 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1405

Score = 451 bits (244), Expect = 9e-124
Identities = 248/250 (99%), Gaps = 0/250 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      AGCACTCTAGTGAGACTGCCACGGTTAACGTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT 60
             |||
Sbjct 1071    AGCACTCTAGTGAGACTGCCACGGTTAACGTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT 1130

Query 61      CATGCCCCCTTATGTCTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGAATACAAATAGATGCAAT 120
             |||
Sbjct 1131    CATGCCCCCTTATGTCTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGAATACAAATAGATGCAAT 1190

Query 121     ACCGCGAGGTGGAGCCAACTATAAAATTATCCCAATTCGGATTGTAATCTGAAACTCG 180
             |||
Sbjct 1191    ACCGCGAGGTGGAGCCAACTATAAAATTATCCCAATTCGGATTGTAATCTGAAACTCG 1250

Query 181     ACTACATGAAGCCGGAGTTGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCC 240
             |||
Sbjct 1251    ACTACATGAAGCCGGAGTTGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCC 1310

Query 241     CGGGCCTTGT 250
             |||
Sbjct 1311    CGGGCCTTGT 1320
```

Figura 5.3 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 13a do reator desnitrificante em escala de bancada R3 e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

Clostridium sulfidigenes é uma das espécies proteolíticas de *Clostridium* que possuem um papel significativo no ciclo do enxofre e na degradação de peptídeos, proteínas e aminoácidos em diferentes ambientes. São fortemente afetados pela presença de compostos orgânicos e inorgânicos de enxofre. Podem utilizar tiosulfato e enxofre elementar como receptores finais de elétrons. São anaeróbios estritos, mesofílicos, proteolíticos, Gram-positivos e formadores de endósporos. Pertencem ao grupo de *Clostridiales* que apresentam baixo conteúdo G+C. As células apresentam mobilidade até a esporulação; formam esporos

terminais de forma ovalada. O crescimento ótimo é verificado a 34°C e pH 6,6 (SALLAM; STEINBUCHER, 2009).

Clostridium sulfidigenes foi isolado a partir de fontes geotermiais (MAYTI et al., 2010), sedimentos (SALLAM; STEINBUCHER, 2009) e culturas de enriquecimento inoculadas com lodo de digestor anaeróbio tratando esgoto municipal (LAKANIEMI et al., 2011).

A amostra 14 corresponde à biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada R3, ao final do período de operação de 30 dias sob a condição de alimentação na proporção de 40% de efluente nitrificado (proveniente do reator R2) e 60% de efluente não nitrificado (proveniente do reator R1), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃. Nesta condição, não foi aplicada a correção da concentração de sulfeto na alimentação; a concentração desse doador de elétrons correspondeu apenas àquela já presente na mistura de efluentes utilizada na alimentação de R3.

A partir da Figura 5.4, verifica-se 100% de identidade entre a sequência de nucleotídeos obtida para a banda *a* referente à amostra 14 do reator desnitrificante R3 e a sequência depositada no *GenBank* para o gene RNAr 16S da bactéria *Pseudomonas* sp. BZ55.

```

>gb|HQ588844.1| Pseudomonas sp. BZ55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1529

Score = 545 bits (295), Expect = 4e-152
Identities = 295/295 (100%), Gaps = 0/295 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      CGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAG 60
           |||
Sbjct 1085    CGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAG 1144

Query 61      ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG 120
           |||
Sbjct 1145    ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG 1204

Query 121     CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAG 180
           |||
Sbjct 1205    CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAG 1264

Query 181     CTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTC 240
           |||
Sbjct 1265    CTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTC 1324

Query 241     GGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT 295
           |||
Sbjct 1325    GGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT 1379

```

Figura 5.4 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 14a do reator desnitrificante em escala piloto e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

Para a banda *e* da mesma amostra 14, obteve-se 100% de identidade entre a sequência analisada e a sequência depositada no *GenBank* para o gene RNAr 16S da bactéria *Pseudomonas stutzeri* RMB6, conforme visto na Figura 5.5. Os alinhamentos foram realizados utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

```

>gb|HQ658767.1| Pseudomonas stutzeri strain RMB6 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1391

Score = 545 bits (295), Expect = 4e-152
Identities = 295/295 (100%), Gaps = 0/295 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      CGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAG 60
           |||
Sbjct 1014    CGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAG 1073

Query 61      ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG 120
           |||
Sbjct 1074    ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG 1133

Query 121     CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAG 180
           |||
Sbjct 1134    CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAG 1193

Query 181     CTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTC 240
           |||
Sbjct 1194    CTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTC 1253

Query 241     GGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT 295
           |||
Sbjct 1254    GGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT 1308

```

Figura 5.5 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 14e do reator desnitrificante em escala de bancada R3 e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

Todas as espécies de *Pseudomonas* apresentam o modo de respiração aeróbia, utilizando oxigênio como receptor final de elétrons para a fosforilação oxidativa. Algumas espécies possuem também um sistema de respiração anaeróbio suplementar, operando concomitantemente com a via aeróbia. Essa via suplementar, que tem sido uma característica determinante para algumas espécies de *Pseudomonas*, utiliza NO_3^- como receptor final de elétrons (respiração do nitrato), segundo Dworkin et al. (2006).

A desnitrificação via respiração do nitrato é um processo catabólico que produz energia. A desnitrificação assimilatória de nitrato como fonte de nitrogênio para o crescimento ocorre através de sua redução para amônia. Algumas espécies de *Pseudomonas* são capazes de utilizar nitrato como um receptor de elétrons alternativo. A respiração do nitrato depende das atividades das enzimas nitrato e nitrito redutases, que são induzidas na presença de nitrato em condições anaeróbias e suprimidas pela presença de oxigênio. Desta forma, níveis de oxigênio desempenham importante função na determinação do sucesso de populações desnitrificantes de espécies de *Pseudomonas* em diferentes habitats.

Pseudomonas são capazes de utilizar aminoácidos como fontes de carbono e nitrogênio e praticamente todas as espécies do gênero apresentam a Via Glicolítica incompleta, dada a ausência da enzima 6-fosfofrutoquinase, desassimilando açúcares e ácidos orgânicos preferencialmente pela Via Entner-Doudoroff, segundo Dworkin et al. (2006).

A capacidade para desnitrificação em condições anaeróbias é amplamente distribuída entre espécies do gênero *Pseudomonas*. Adicionalmente, diversas enzimas dehalogenases não requerem oxigênio e funcionam nessas condições. Halobenzoatos podem ser prontamente degradados em condições desnitrificantes por esses micro-organismos (HÄGGBLOM et al., 1996; VARGAS et al., 2000). A habilidade para degradação desses compostos em condições anóxicas é largamente distribuída entre membros do filo *Proteobacteria* e várias linhagens de espécies de *Pseudomonas*, estreitamente relacionadas a *P. stutzeri* (SONG et al., 2000;

VARGAS et al., 2000), foram isoladas e caracterizadas como capazes de degradar 2-fluoro-, 4-fluoro- e 3-clorobenzoato. *P. stutzeri* possui importante papel na degradação de halobenzoatos em condições naturais, ainda que, em condições desnitrificantes, tais mecanismos não estejam bem elucidados.

A capacidade para utilização de fontes de carbono orgânicas e inorgânicas representa uma vantagem competitiva de *Pseudomonas stutzeri* em relação a outras bactérias redutoras de nitrato oxidadoras de sulfeto (NR-SOB) autotróficas obrigatórias, como *Thiomicrospira denitrificans* e *Thiobacillus denitrificans*.

Foi obtida identidade de 99% entre as sequências parciais do gene RNAr 16S associadas à banda *b* da amostra 15 e à bactéria *Aeromonas hydrophila* linhagem F4 (como visto na Figura 5.6).

```
>gb|GU296111.1| Aeromonas hydrophila strain F4 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1417

Score = 627 bits (339), Expect = 2e-176
Identities = 343/345 (99%), Gaps = 0/345 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GCTGCATGGCTGTCTTCAGCTCGTGTCTTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC 60
      |||
Sbjct 997 GCTGCATGGCTGTCTTCAGCTCGTGTCTTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC 1056

Query 61 AACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCAAGGGAGACTGCCGGTGAT 120
      |||
Sbjct 1057 AACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCAAGGGAGACTGCCGGTGAT 1116

Query 121 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACAC 180
      |||
Sbjct 1117 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACAC 1176

Query 181 ACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAA 240
      |||
Sbjct 1177 ACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAA 1236

Query 241 AGCGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT 300
      |||
Sbjct 1237 AGCGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT 1296

Query 301 AATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT 345
      |||
Sbjct 1297 AATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT 1341
```

Figura 5.6 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 15b do reator desnitrificante em escala de bancada R3 e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

A amostra 15 corresponde à biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada R3, ao final do período de operação de 30 dias com alimentação na proporção de 40% de efluente nitrificado (proveniente do reator R2) e 60% de efluente não nitrificado (proveniente

do reator R1), sem adição de NaHCO_3 e com correção da concentração de sulfeto na alimentação por meio da adição de $18 \text{ mg S}^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$.

Linhagens pertencentes a *Aeromonas hydrophila* ocorrem em extensa variedade de amostras clínicas e ambientais. São capazes de crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Fermentam glicose (com produção de gás, ocasionalmente), são oxidase e catalase-positivas e apresentam elevado conteúdo GC (57 – 63 mol %). A maioria das linhagens apresenta crescimento ótimo a 35 – 37°C, bem como a 20 – 25°C (DWORKIN et al., 2006).

Para a sequência parcial do gene RNAr 16S obtida a partir da banda *c* da amostra 15, foi realizado alinhamento com 100% de identidade para 315 pb com a de *Aeromonas aquariorum* MDC47, conforme visto na Figura 5.7.

```
>gb|EU085557.2| Aeromonas aquariorum strain MDC47 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1503

Score = 582 bits (315), Expect = 3e-163
Identities = 315/315 (100%), Gaps = 0/315 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAA 60
             |||
Sbjct 1073    GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAA 1132

Query 61      TGGTGGGAACCTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA 120
             |||
Sbjct 1133    TGGTGGGAACCTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA 1192

Query 121     GTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCT 180
             |||
Sbjct 1193    GTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCT 1252

Query 181     GCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGC 240
             |||
Sbjct 1253    GCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGC 1312

Query 241     AACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATA 300
             |||
Sbjct 1313    AACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATA 1372

Query 301     CGTICCCGGGCCTTG 315
             |||
Sbjct 1373    CGTICCCGGGCCTTG 1387
```

Figura 5.7 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 15c do reator desnitrificante em escala de bancada R3 e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

O número de *Aeromonas* (*Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*; *Aeromonadales*; *Aeromonadaceae*) é elevado em esgotos e efluentes domésticos e industriais, os quais podem ser importantes fontes desses micro-organismos no ambiente. *Aeromonas* foram isoladas de esgotos brutos e tratados, lodos ativados e de compartimentos de sistemas de drenagem de águas residuárias (DWORKIN et al., 2006).

Comparada com outros micro-organismos indicadores, a presença de *Aeromonas* é igualmente indesejável devido a sua associação com um vasto espectro de doenças humanas. Não obstante, bactérias desse gênero têm sido frequentemente detectadas em reservatórios de água potável, mesmo naqueles para os quais foi aplicado o tratamento de desinfecção por cloro (KERSTERS; VERSTRAETE, 1996).

5.1.2 Comunidade bacteriana estabelecida no reator desnitrificante em escala piloto

A Figura 5.8 apresenta os padrões de bandas obtidos para as amostras retiradas do reator desnitrificante em escala piloto ao término das condições estudadas C1, C2 e C3, por meio de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40 – 60%) dos fragmentos do gene RNAr 16S amplificados por PCR utilizando *primers* para o Domínio *Bacteria*.

As amostras 7 e 8 correspondem à biomassa do reator desnitrificante em escala piloto alimentado com efluente não nitrificado (Condição C1). As amostras 17 e 18 correspondem à biomassa do reator desnitrificante em escala piloto ao término da Condição C2, em que foi alimentado com mistura de 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado. As amostras 19 e 20 referem-se à Condição C3, em que o reator desnitrificante foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%), conforme a Tabela 4.7.

Como ressaltado para a aplicação do método de PCR/DGGE para as amostras do reator em escala de bancada no item anterior, foi excisada a totalidade de fragmentos de

poliacrilamida que apresentaram bandas discriminadas no gel. Entretanto, após as reações de sequenciamento, foram obtidas sequências viáveis (tamanho superior a 200 pares de bases, eletroferograma apresentando picos inequívocos) apenas para as bandas identificadas pelos retângulos e caracteres alfanuméricos.

Figura 5.8 – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40 – 60%) dos fragmentos do gene RNAr 16S amplificados por PCR utilizando *primers* para o Domínio *Bacteria* a partir de amostras do reator desnitrificante em escala piloto. As amostras 7 e 8 correspondem à biomassa coletada das câmaras anaeróbia e desnitrificante, respectivamente, do reator alimentado com efluente não nitrificado (Condição C1). As amostras 17 e 18 correspondem à biomassa retirada da câmara desnitrificante e anaeróbia do reator, respectivamente, ao término da Condição C2 (alimentação com 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado). As amostras 19 e 20 referem-se à da câmara desnitrificante e anaeróbia do reator ao término da Condição C3, em que foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%). As amostras 21 e 22 referem-se ao enriquecimento de cultura desnitrificante a partir das amostras 19 e 20. As bandas identificadas pelos retângulos representam aquelas para as quais as reações de sequenciamento foram bem sucedidas.

Como verificado para o reator em escala de bancada, houve redução do número de bandas em função da seleção de populações bacterianas ao longo do período de operação do reator desnitrificante em escala piloto. A Figura 5.9 revela que populações detectadas na amostragem da condição C1 não foram encontradas nas amostras das coletas C2 e C3 subsequentes. Novamente, pode-se atribuir tais resultados ao favorecimento de populações desnitrificantes autotróficas sobre as heterotróficas obrigatórias, prejudicadas pela escassez de matéria orgânica característica dos reatores nas condições em estudo.

Figura 5.9 – Análise densitométrica dos perfis de bandas do gel de DGGE para as amostras coletadas do reator desnitrificante em escala piloto nas condições operacionais C1, C2 e C3. (a) Identificação das bandas no gel de gradiente desnaturante e dendograma associado. (b) Dendograma e sua respectiva matriz de similaridade. Os padrões de bandas do gel de DGGE foram comparados pelo coeficiente de similaridade *Dice*. A matriz de similaridade resultante foi convertida em dendograma por meio do algoritmo de *clustering* UPGMA e a correlação entre as similaridades derivadas do dendograma e a matriz de similaridade foi calculada pelo método *Cophenetic Correlation*.

As amostras 7 e 8, retiradas respectivamente das câmaras anaeróbia e desnitrificante do reator na condição de alimentação com efluente não nitrificado (C1), apresentaram elevada

similaridade entre si (95,7%). Esta pequena variação entre os perfis de bandas após 45 dias de operação do sistema piloto (a partir da autoinoculação do seu reator principal) pode ser devida ao tempo necessário para o estabelecimento das populações nos microambientes das câmaras do reator em função de seu nicho ecológico.

A amostra 17 que corresponde à biomassa coletada da câmara desnitrificante do reator ao término da condição C2 (alimentação com 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado) apresentou similaridade de 72,7% com as amostras 7 e 8 coletadas na condição de alimentação anterior.

A partir desses resultados e daqueles obtidos por sequenciamento de DNA contido nas bandas (Tabela 5.2), verifica-se que a diversidade microbiana sofreu modificação em resposta às condições ambientais e diferenciou-se por meio da seleção e favorecimento de populações que apresentam capacidade para desnitrificação tais como espécies do gênero *Ralstonia*, identificadas na referida amostra 17. A amostra 18, referente à câmara anaeróbia para a mesma condição C2, apresentou 66,7% de similaridade com 17.

As amostras 19 e 20 foram extraídas da câmara desnitrificante e anaeróbia, respectivamente, do reator principal à conclusão da Condição C3, em que foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%). Apresentaram 84,2% de similaridade entre si, que foi a menor diferença entre as câmaras anaeróbia e desnitrificante verificada.

As amostras 21 e 22 correspondem aos enriquecimentos de cultura desnitrificante heterotrófica, realizados a partir da inoculação de Meio Nutriente acrescido de nitrato (conforme descrito no item 4.7.1) com alíquotas de lodo das amostras 19 e 20, respectivamente. Tais amostras apresentaram entre si similaridades de 80% (19 e 21) e 85,7% (20 e 22), revelando porcentagem de variação semelhante na estrutura da comunidade microbiana devido ao enriquecimento, quando comparadas às de seus inóculos.

A Tabela 5.2 apresenta a identificação das sequências parciais de genes RNAr 16S obtidas a partir dos fragmentos de poliacrilamida excisados do gel de DGGE de amostras do reator desnitrificante em escala de bancada, amplificadas com *primers* para o Domínio *Bacteria*. As sequências foram comparadas à base de dados de sequências de nucleotídeos do *GenBank* (NCBI), por meio do algoritmo BLASTn. As respectivas porcentagens de similaridade estão igualmente expressas nessa Tabela.

Tabela 5.2 – Identificação filogenética das sequências parciais de genes RNAr 16S obtidas a partir do gel de DGGE de amostras do reator desnitrificante em escala piloto, amplificadas com *primers* para o Domínio *Bacteria*, comparadas às sequências depositadas na base de dados do *GenBank*.

Amostra	Taxonomia	Nº de acesso	Similaridade	Referência
7c	<i>Acidobacteria</i>	GQ406202.1	99%	Nold et al. (2010)
7c	<i>Chloroflexi</i>	GQ406182.1	99%	Nold et al. (2010)
17b	<i>Cupriavidus basilensis</i>	FN597608.1	99%	Cuadrado et al. (2010)
17b	<i>Ralstonia</i> sp.	GU966534.1	99%	Huang et al. (2010)

As amostras 7 e 8 correspondem à biomassa das câmaras anaeróbia e desnitrificante do reator principal em escala piloto ao término da operação sob a condição C1, alimentado apenas com efluente anaeróbio não nitrificado. As Figuras 5.10 e 5.11 apresentam a comparação entre as sequências obtidas da amostra 7 do reator em escala piloto e as sequências depositadas no *GenBank*, por meio da ferramenta BLASTn (NCBI). Verifica-se a identidade de 99% entre a sequência obtida e a sequência do gene RNAr 16S de clones pertencentes aos filos *Acidobacteria* e de *Chloroflexi*.

Acidobacteria foi estabelecido como um novo filo do Domínio *Bacteria*, consistentemente detectado em diferentes habitats ao redor do globo por meio de pesquisas moleculares baseadas em DNAr 16S. Sua diversidade filogenética, ubiquidade e abundância

sugerem seu relevante papel ecológico e extensa versatilidade metabólica. Uma entre as notáveis descobertas de pesquisas em ecologia molecular de solos foi a frequente detecção de sequências afiliadas a *Acidobacteria*; frequentemente, entre 30 e 50% das sequências obtidas em bibliotecas de clones de solos pertencem a esse filo (QUAISER et al., 2003).

```
>[gb]GQ406202.1| Uncultured Acidobacteria bacterium clone CS-42-8 16S ribosomal
RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic
spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=2173

Score = 446 bits (241), Expect = 4e-122
Identities = 247/250 (99%), Gaps = 0/250 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GTCGGGAACCTCTACAGGGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAG 60
            |||
Sbjct 1110    GTCGGGAACCTCTACAGGGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAG 1169

Query 61     TCCTCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAAACCGTTG 120
            |||
Sbjct 1170    TCCTCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAAACCGTTG 1229

Query 121    CCAAGTCGCGAGATGGAGCTAATCGGAGAAAGCCATCCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCA 180
            |||
Sbjct 1230    CGAAGTCGCGAGATGGAGCTAATCGGAGAAAGCCATCCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCA 1289

Query 181    ACTCGACTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGTGTATCAGAATGATACGGTGAATAC 240
            |||
Sbjct 1290    ACTCGACTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGTGTATCAGAACGATACGGTGAATAC 1349

Query 241    GTTCCCGGGC 250
            |||
Sbjct 1350    GTTCCCGGGC 1359
```

Figura 5.10 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 7c do reator desnitrificante em escala piloto e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

Entretanto, sequências associadas a *Acidobacteria* foram igualmente identificadas em ambientes de água doce, sedimentos marinhos (BARNES et al., 1999), em lodo de esgoto (LAYTON et al., 2000) e em biorreatores tratando águas residuárias (LAPARA et al., 2000).

As habilidades metabólicas dos micro-organismos pertencentes a *Chloroflexi* ainda necessitam ser melhor elucidadas, dado que ainda são poucos os membros representativos cultiváveis isolados. Contudo, dado ser grupo abundante em diversos ambientes, vários estudos empenharam-se em investigar sua função metabólica, alguns entre os quais

propuseram sua função potencial na degradação de carboidratos (SEKIGUCHI et al., 2001; KINDAICHI et al., 2004; ARIESYADY et al., 2007).

```
>|gb|GQ406182.1| Uncultured Chloroflexi bacterium clone ASCR-42-2 16S ribosomal
RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic
spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=2201

Score = 446 bits (241), Expect = 4e-122
Identities = 247/250 (99%), Gaps = 0/250 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GTCGGGAACCTCTACAGGGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAG 60
          |||
Sbjct 1091    GTCGGGAACCTCTACAGGGACTGCCCGGGTTAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGATGTCAAG 1150

Query 61      TCCTCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAAACCGTTG 120
          |||
Sbjct 1151    TCCTCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAAACCGTTG 1210

Query 121     CCAAGTCGCGAGATGGAGCTAATCGGAGAAAGCCATCCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCA 180
          |||
Sbjct 1211    CGAAGTCGCGAGATGGAGCTAATCGGAGAAAGCCATCCTCAGTTCGGATTGCAGTCTGCA 1270

Query 181     ACTCGACTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGTGTATCAGAATGATACGGTGAATAC 240
          |||
Sbjct 1271    ACTCGACTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGTGTATCAGAATGATACGGTGAATAC 1330

Query 241     GTTCCCGGGC 250
          |||
Sbjct 1331    GTTCCCGGGC 1340
```

Figura 5.11 – Alinhamento entre a sequência obtida da amostra 7c do reator desnitrificante em escala piloto e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

Rivière et al. (2009) analisaram a diversidade microbiana em sete digestores anaeróbios em grande escala com o objetivo de verificar se diferenças nas comunidades microbianas poderiam explicar a variação de suas eficiências. Os digestores estavam localizados em plantas municipais de tratamento de águas residuárias, recebendo essencialmente efluente doméstico e, para alguns deles, uma pequena fração de efluentes industriais. Nesses reatores, a matéria orgânica foi degradada a uma eficiência variando entre 40% e 55% de sólidos voláteis removidos. Foram selecionados para representar reatores convencionais trabalhando sob condições operacionais padrão, degradando sólidos voláteis e produzindo biogás.

Os resultados revelaram que a comunidade microbiana de um digestor anaeróbio analisado por Rivière et al. (2009) foi composta por filotipos comumente encontrados em

todos os digestores anaeróbios amostrados e também por filotipos específicos. Análises estatísticas demonstraram que a comunidade bacteriana pôde ser descrita por um modelo de três componentes: um terço composto por um grupo principal de filotipos comuns à maioria dos digestores, um terço por filotipos comuns a apenas alguns digestores e o restante por filotipos específicos. O grupo principal foi composto por apenas seis OTUs relacionadas a *Chloroflexi*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Synergistetes* (RIVIERE et al., 2009).

A biomassa do reator desnitrificante em escala piloto que constituiu a amostra 17 foi coletada ao término da condição de operação C2, com alimentação na proporção de 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado, aproximadamente 30 dias após a conclusão da primeira condição em estudo e sua respectiva amostragem (C1).

A sequência de nucleotídeos obtida a partir do sequenciamento parcial do gene RNAr 16S da banda recuperada dessa amostra apresentou 99% de identidade com o de *Cupriavidus basilensis* e o de *Ralstonia* sp. (Figura 5.12).

Apenas as sequências de tamanho maior ou igual a 200 pares de bases, à exceção da amostra 17, foram consideradas para o alinhamento e comparação com as sequências do *GenBank*, de modo a garantir confiabilidade às análises. Tal requerimento é justificado pelo exemplo da amostra 17, para a qual a reação de sequenciamento resultou em um fragmento de apenas 161 pb (17b); ao compará-lo com as sequências no *GenBank*, foram encontrados mais de dois alinhamentos possíveis (estão citados aqui a identidade de 99% com *Ralstonia* sp. e *Cupriavidus basilensis*).

No entanto, *Ralstonia* corresponde ao basônimo de *Cupriavidus*, ou seja, constitui-se o nome original do táxon (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, http://old.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature.php; NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>), o que mantém a análise dessa amostra válida.

```

>[emb|FN597608.1| Cupriavidus basilensis partial 16S rRNA gene, type strain CCUG
49340T
Length=1387

Score = 287 bits (155), Expect = 1e-74
Identities = 161/164 (99%), Gaps = 0/164 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TGTCTTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACGAACCGGAGGAAG 60
Sbjct 1049   TGTCTTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACGAACCGGAGGAAG 1108

Query 61     GTGGGGATGACATCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACCTCATAACAATG 120
Sbjct 1109   GTGGGGATGACGTCAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAACAATG 1168

Query 121    GTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCA 164
Sbjct 1169   GTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCA 1212

>[gb|GU966534.1| Ralstonia sp. enrichment culture clone SCN-3 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
Length=1439

Score = 287 bits (155), Expect = 1e-74
Identities = 161/164 (99%), Gaps = 0/164 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TGTCTTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACGAACCGGAGGAAG 60
Sbjct 1079   TGTCTTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACGAACCGGAGGAAG 1138

Query 61     GTGGGGATGACATCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACCTCATAACAATG 120
Sbjct 1139   GTGGGGATGACGTCAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAACAATG 1198

Query 121    GTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCA 164
Sbjct 1199   GTGCGTACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCA 1242

```

Figura 5.12 – Alinhamentos entre a sequência obtida da amostra 17b do reator desnitrificante em escala piloto e as depositadas no *GenBank*, realizado utilizando a ferramenta BLASTn, NCBI.

Estudos recentes examinaram a organização genética das enzimas associadas à desnitrificação em uma variedade de isolados. O gene *nosZ* foi encontrado em plasmídeos de bactérias pertencentes ao gênero *Ralstonia* (SCALA; KERKHOF, 1999). A redução do óxido nitroso, etapa final na via da desnitrificação, é catalisada pela enzima óxido nitroso redutase. O gene *nosZ* que codifica essa enzima é praticamente exclusivo de bactérias desnitrificantes e, atualmente, tem sido utilizado para detecção específica de DNA de desnitrificantes em amostras ambientais (SCALA; KERKHOF, 1998).

O módulo anaeróbio do reator principal RA do sistema piloto recebia esgoto bruto. Desta forma, o efluente líquido desse módulo continha substâncias orgânicas (matéria orgânica residual) e inorgânicas (N-amoniaco e sulfeto, principalmente), além de gases

dissolvidos (metano, gás carbônico, sulfeto de hidrogênio). A câmara nitrificante recebia o mesmo afluente. A câmara anóxica recebia, além desses, os compostos oxidados (nitrato e sulfato). Tais configurações podem auxiliar na compreensão de que condições mixotróficas estabeleceram-se nos vários segmentos em que foram coletadas as amostras, bem como para explicar as condições nas proximidades da zona de mistura central, segundo descrito por Souza (2011), em que parte da unidade anaeróbia foi afetada pela condição anóxica dessa zona. As sequências de RNAr 16S obtidas refletiram a transição entre a condição anaeróbia e a desnitrificante acima descrita.

As metodologias aplicadas neste estudo atenderam aos objetivos propostos para esta pesquisa, a saber, a caracterização da comunidade microbiana estabelecida nos reatores desnitrificantes ao longo de seus períodos operacionais. Vale ressaltar que a escolha pela estratégia de investigação do gene RNAr 16S subentende a obtenção de sequências de uma vasta gama de micro-organismos, uma vez que o gene é bem conservado no Domínio *Bacteria*. Naturalmente, havia uma grande expectativa quanto à obtenção de sequências de micro-organismos especificamente associados à desnitrificação autotrófica em meio à diversidade e complexidade das comunidades microbianas estabelecidas nos reatores.

Deve-se ressaltar que é de fundamental importância dispor de ferramentas adequadas para cada conjunto de questões a serem respondidas durante determinada pesquisa. Desta forma, para atender ao objetivo principal deste estudo, que consistiu na caracterização das comunidades microbianas estabelecidas nos reatores desnitrificantes ao longo dos distintos períodos operacionais, as metodologias moleculares baseadas no DNAr 16S proporcionaram resultados para a composição de panoramas estruturais de tais comunidades, abrangendo as populações responsáveis não somente pela desnitrificação como também pelos demais processos que integram o metabolismo anaeróbio.

Uma investigação pode incluir objetivos mais específicos como a caracterização de determinado processo pela aplicação da mesma técnica de PCR/DGGE, definindo-se como alvo um determinado gene que codifique para um produto proteico envolvido em uma reação bioquímica característica integrante de um processo a ser monitorado, como é o caso dos genes *nar*, *nirK*, *nirS*, *norB*, *norZ*, *nosZ*, especificamente envolvidos na desnitrificação.

Neste âmbito, de modo a investigar também as populações especificamente associadas à desnitrificação autotrófica presentes nos reatores estudados, foram realizadas amplificações por PCR utilizando *primers* altamente específicos, conforme descrito acima, no item 4.6.2, nas metodologias propostas por Höfle et al. (2005) e Zhang et al. (2009).

Em abordagem para recuperar sequências do gene RNAr 16S quase completas de um taxon específico, Höfle et al. (2005) propuseram o uso de *primers* específicos (OST1F e OST1R) para micro-organismos semelhantes a *Thiomicrospira*, combinados com *primers* universais. Na presente pesquisa, foram obtidos produtos de PCR de tamanho esperado de aproximadamente 880 pares de bases (pb) para as amplificações com os *primers* OST1F e 1492R para 100% das amostras de ambos os reatores desnitrificantes (Figura 5.13). Tais resultados indicam que micro-organismos semelhantes a *Thiomicrospira* estiveram possivelmente presentes nessas amostras.

Figura 5.13 – Gel de agarose 1,4% para separação dos produtos obtidos a partir de PCR específicas pela aplicação do *primer* específico OST1F e do *primer* universal 1492R, segundo Höfle et al. (2005), para todas as amostras de DNA provenientes dos reatores desnitrificantes em escala de bancada (amostras 13, 14, 15) e piloto (amostras 16, 17, 18, 19 e 20). Amostras de biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada alimentado com 40% de efluente nitrificado e 60% de efluente não nitrificado: amostra 13 (condição C4), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e de 18 mg S²⁻.L⁻¹; amostra 14 (condição C5), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e sem adição de S²⁻; amostras 15 (condição C7), sem adição de NaHCO₃ e com adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹. A amostra 16 corresponde à biomassa do reator desnitrificante em escala piloto alimentado com efluente não nitrificado (condição C1); a amostra 17 corresponde à biomassa do reator ao término da operação C2 (alimentação com 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado); as amostras 18, 19 e 20 referem-se à Condição C3, em que o reator desnitrificante foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%). Pd: padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (de 100 a 2000 pb, Invitrogen).

Produtos de PCR de tamanho esperado de aproximadamente 880 pb nas amplificações com os *primers* EUB 8F e OST1R foram obtidos para 75% das amostras, apresentando diferentes intensidades de bandas. As amostras 14 (reator em escala de bancada) e 20 (reator em escala piloto) não apresentaram especificidade com o par de *primers* utilizado para amplificação da porção 5' da sequência do gene RNAr 16S de micro-organismos semelhantes a *Thiomicrospira*, como pode ser verificado na Figura 5.14.

Figura 5.14 – Gel de agarose 1,4% para separação dos produtos obtidos a partir de PCR específicas pela aplicação do *primer* universal EUB 8F e do *primer* específico OST1R, segundo Höfle et al. (2005), para todas as amostras de DNA provenientes dos reatores desnitrificantes em escala de bancada (amostras 13, 14, 15) e piloto (amostras 16, 17, 18, 19 e 20). Amostras de biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada alimentado com 40% de efluente nitrificado e 60% de efluente não nitrificado: amostra 13 (condição C4), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e de 18 mg S²⁻.L⁻¹; amostra 14 (condição C5), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e sem adição de S²⁻; amostras 15 (condição C7), sem adição de NaHCO₃ e com adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹. A amostra 16 corresponde à biomassa do reator desnitrificante em escala piloto alimentado com efluente não nitrificado (condição C1); a amostra 17 corresponde à biomassa do reator ao término da operação C2 (alimentação com 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado); as amostras 18, 19 e 20 referem-se à Condição C3, em que o reator desnitrificante foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%). Pd: padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (de 100 a 2000 pb, Invitrogen).

Somente duas dentre as oito amostras (25%) dos reatores apresentaram DNA amplificado por PCR com o uso dos *primers* S-De-F e 1392R, de acordo com o método descrito por Zhang et al. (2009), ambas coletadas do reator desnitrificante em escala de bancada (Figura 5.15). Uma vez que o *primer* S-De-F foi desenhado especificamente para *Sulfurimonas denitrificans*, presume-se que as amostras 13 e 15 continham micro-organismos semelhantes a esta bactéria autotrófica redutora de nitrato e oxidadora de sulfeto.

Figura 5.15 – Gel de agarose 1,4% para separação dos produtos obtidos a partir de PCR específicas pela aplicação do *primer* específico S-De-F e do *primer* universal 1392R, segundo Zhang et al. (2009), para todas as amostras de DNA provenientes dos reatores desnitrificantes em escala de bancada (amostras 13, 14, 15) e piloto (amostras 16, 17, 18, 19 e 20). Amostras de biomassa do reator desnitrificante em escala de bancada alimentado com 40% de efluente nitrificado e 60% de efluente não nitrificado: amostra 13 (condição C4), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e de 18 mg S²⁻.L⁻¹; amostra 14 (condição C5), com adição de 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ e sem adição de S²⁻; amostras 15 (condição C7), sem adição de NaHCO₃ e com adição de 18 mg S²⁻.L⁻¹. A amostra 16 corresponde à biomassa do reator desnitrificante em escala piloto alimentado com efluente não nitrificado (condição C1); a amostra 17 corresponde à biomassa do reator ao término da operação C2 (alimentação com 20 – 30% de efluente nitrificado e 70 – 80% de efluente não nitrificado); as amostras 18, 19 e 20 referem-se à Condição C3, em que o reator desnitrificante foi alimentado com mistura de efluente nitrificado (40 – 60%) e efluente não nitrificado (40 – 60%). Pd: padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (de 100 a 2000 pb, Invitrogen).

5.1.3 Clonagem de fragmentos do gene RNAr 16S bacteriano a partir de amostra do reator desnitrificante em escala piloto

Adicionalmente, foi realizada a clonagem de fragmentos do gene RNAr 16S a partir da amplificação do DNA extraído da amostra 19, proveniente da câmara anaeróbia do reator principal RA do sistema em escala piloto ao término da condição C3, de modo a auxiliar a compreensão dos fenômenos ocorridos em seu compartimento inferior, conforme explicado acima.

Os produtos de PCR com os *primers* 27F e 1100R (LANE, 1991) que apresentaram tamanhos e qualidade esperados foram purificados (Figura 5.16) e submetidos aos

procedimentos posteriores para clonagem (adenilação, reação de ligação e transformação de células competentes com o vetor recombinante).

Figura 5.16 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificação dos produtos de PCR com *primers* 27F/1100R da amostra 19 (a, b: em duplicata), proveniente da condição C3 de operação do reator desnitrificante em escala piloto, para clonagem de fragmentos do gene RNAr 16S. Pd: padrão de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (de 100 a 2000 pb, Invitrogen).

Após o período de 12 horas de crescimento em Meio LB suplementado com ampicilina das colônias transformadas (brancas) pinçadas das placas, foi realizada a amplificação do inserto a partir dos plasmídeos com o uso dos *primers* M13F e M13R (MESSING, 1983).

Apesar do elevado número de colônias (150) que foram pinçadas das placas e conduzidas ao crescimento em Meio LB com ampicilina, foram verificadas dificuldades para obtenção do número desejado de clones (comumente, 120 clones), ainda que tenham sido tomados os procedimentos que favorecem a obtenção do número de clones necessário.

Um desses procedimentos consistiu em promover o resfriamento das placas a 4°C, imediatamente após o período de incubação por 12 horas a 36°C, de modo a realçar a pigmentação das colônias azuis. O período de resfriamento foi controlado (duração de aproximadamente uma hora) para evitar o aparecimento de colônias-satélite.

A redução desse número teve início no crescimento em meio líquido das colônias pinçadas das placas: não foi observado crescimento para 10 – 15% dos tubos. Na etapa seguinte, em que foi realizada a amplificação dos plasmídeos, tal redução foi ainda mais expressiva, como pode ser verificado na Figura 5.17 (a, b e c): de 119 clones, apenas 44 (aproximadamente 37%) apresentaram amplificação bem sucedida de plasmídeos após três tentativas.

Figura 5.17 – Géis de agarose 0,8% para verificação dos produtos de PCR com os *primers* M13 para amplificação dos plasmídeos (a, b, c). Pd: padrão de massa molecular *High Mass* 100, 50, 25 ng/μL; tamanhos: 3000, 1000 e 250 pb (Invitrogen).

As 28 sequências de nucleotídeos obtidas para as amostras que apresentaram bem sucedida amplificação de seus plasmídeos foram comparadas àquelas depositadas no *GenBank* (Tabela 5.3).

Apesar de apresentar vantagens como a precisão filogenética e a detecção da maioria dos micro-organismos, incluindo grupos minoritários, a clonagem requer muito tempo para sua execução e é menos adequada para análise de grandes conjuntos de amostras, por exemplo, no monitoramento de mudanças nas comunidades microbianas naturais ou engenheiradas ao longo do tempo, particularmente se vários pontos de amostragem são requeridos (SANZ; KOCHLING, 2007).

Por essas razões, foi necessária a escolha de uma amostra entre todas as obtidas, a saber, a amostra 19, da condição C3 de operação do sistema piloto, por ser a correspondente da etapa em que ocorreram os processos de interesse a este estudo e inesperados para o compartimento inferior anaeróbio do reator RA.

Tabela 5.3 – Identidade das sequências obtidas por clonagem de fragmentos do gene RNAr 16S bacteriano por comparação com a base de dados do *GenBank*.

	Micro-organismo	Filo ¹	Número de acesso	Tamanho (pb)	Identidade (%)	Expect	Referência
1	Uncultured <i>Aminanaerobia</i>		CU920428.1	1340	99	0.0	Riviere et al. (2009)
2	<i>Aminomonas paucivorans</i>	<i>Synergistetes</i>	AF072581.1	1504	91	0.0	Baena et al. (1999)
3	Uncultured <i>Deferribacteres</i>	<i>Deferribacteres</i>	HQ183983.1	1481	90	0.0	Liu et al. (2011)
4	<i>Megasphaera paucivorans</i>	<i>Firmicutes</i>	DQ223730.1	1553	90	0.0	Juvonen & Suihko (2006)
5	Uncultured bacterium		EU360307.1	1419	93	0.0	Park et al. (2007)
6	<i>Veillonellaceae</i> bacterium	<i>Firmicutes</i>	AB603498.1	1127	95	0.0	Ise et al. (2011)
7	<i>Dialister succinatiphilus</i>	<i>Firmicutes</i>	AB370249	879	93	0.0	Morotomi et al. (2008)
8	Uncultured bacterium		GQ458235	1518	90	0.0	Panichnumsin et al. (2009)
9	<i>Thermanaerovibrio</i> sp.	<i>Synergistetes</i>	FN556061.1	1388	90	0.0	Sayeh et al. (2009)
10	Uncultured <i>Synergistetes</i>	<i>Synergistetes</i>	CU919186.1	1339	99	0.0	Riviere et al. (2009)
11	<i>Synergistetes</i> bacterium	<i>Synergistetes</i>	HQ012836.1	1507	90	0.0	Ziv-El et al. (2011)
12	<i>Synergistetes</i> bacterium	<i>Synergistetes</i>	HQ012836.1	960	92	0.0	Ziv-El et al. (2011)
13	Uncultured prokaryote		GU208245.1	1495	98	0.0	Song et al. (2012)
14	Uncultured bacterium		FJ982821.1	840	97	0.0	Cardinali-Rezende et al. (2009)
15	Uncultured <i>Deferribacteres</i>	<i>Deferribacteres</i>	HQ183983	1481	98	0.0	Liu et al. (2011)
16	Uncultured bacterium		GQ136248.1	1366	91	0.0	Perkins et al. (2009)
17	<i>Propionibacterium</i> sp.	<i>Actinobacteria</i>	EU980607.1	1484	91	0.0	Diaz et al. (2008)
18	Uncultured bacterium		EU864443	1474	98	0.0	Li et al. (2008)
19	<i>Synergistetes</i> bacterium	<i>Synergistetes</i>	HQ012836.1	1507	95	0.0	Ziv-El et al. (2011)
20	Uncultured <i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>	CU926241	1368	91	0.0	Riviere et al. (2009)

21	Iron-reducing bacterium		FJ269063	1520	83	2e-46	Wang et al. (2008)
22	Uncultured bacterium		GQ458235	1518	78	1e-68	Panichnumsin et al. (2009)
23	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>Proteobacteria</i>	AF192154	1542	91	0.0	Loubinoux et al. (2000)
24	Bacterium enrichment culture		GU080088.1	1127	85	0.0	Selesi et al. (2010)
25	Uncultured <i>Aminanaerobia</i>		CU926781	1341	94	0.0	Riviere et al. (2009)
26	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	<i>Synergistetes</i>	CP001818	893	86	0.0	Chovatia et al. (2009)
27	Uncultured <i>Synergistetes</i>	<i>Synergistetes</i>	CU926853	1339	99	0.0	Riviere et al. (2009)
28	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i>	<i>Proteobacteria</i>	AB212873	1482	86	0.0	Qiu et al. (2008)

¹À exceção das bactérias não cultiváveis, estão indicados os filos aos quais pertencem os micro-organismos identificados.

A distribuição dos micro-organismos identificados entre os *taxa* está apresentada na Figura 5.18. Filotipos dos clones obtidos para a amostra 19, representativa da condição C3 de operação do reator principal RA do sistema em escala piloto, foram associados a bactérias não cultiváveis provenientes de amostras ambientais com micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbia em reatores tratando água residuária (32%), *Synergistetes* (29%), *Firmicutes* envolvidos na digestão anaeróbia de lodo (14%), *Deferribacteres* (7%) e *Proteobacteria* (7%).

Figura 5.18 – Distribuição de filotipos para os clones obtidos para a amostra 19 da câmara anaeróbia do reator desnitrificante em escala piloto na condição de operação C3.

Propionibacterium sp. (*Actinobacteria*; *Actinomycetales*; *Propionibacteriaceae*; *Propionibacterium*) foi relacionada a comunidade microbiana de reatores UASB tratando água residuária industrial (DIAZ et al., 2008).

Aproximadamente um terço dos filotipos identificados foi associado a micro-organismos pertencentes ao filo *Synergistetes*: *Aminomonas paucivorans*, *Thermanaerovibrio* e *Thermanaerovibrio acidaminovorans* e bactérias não cultiváveis (*Synergistetes*; *Synergistia*; *Synergistales*; *Synergistaceae*). Bactérias pertencentes ao filo

Synergistetes foram caracterizadas como anaeróbias mesofílicas e podem utilizar aminoácidos e prover ácidos graxos de cadeia curta e sulfato para metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato (VARTOUKIAN et al., 2007). *Synergistetes* foram isoladas de reator UASB tratando águas residuárias (QIU; SEKIGUCHI, 2010, não publicado), dados em consonância com os desta pesquisa.

Bactérias do filo *Firmicutes* são sintróficas capazes de degradar ácidos graxos voláteis como butirato e seus análogos, produzindo H₂, que por sua vez é utilizado por metanogênicas hidrogenotróficas. Com base no conhecimento atual sobre o metabolismo dos micro-organismos anaeróbios, o grupo principal inclui bactérias que degradam carboidratos, proteínas e aminoácidos durante as etapas de hidrólise e fermentação, bem como espécies acetogênicas que degradam ácidos graxos voláteis para produzir acetato (RIVIERE et al., 2009).

Entre os filotipos desta biblioteca genômica, foram identificados os gêneros *Dialister* e *Megasphaera* como representantes do filo *Firmicutes* (*Bacteria; Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae*).

Desulfovibrio desulfuricans (*Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales Desulfovibrionaceae; Desulfovibrio*) possui a enzima nitrito redutase (NIR) multiheme e apresenta a habilidade para redução de NO a N₂O (COSTA et al., 1990), estando desta forma associado ao processo de desnitrificação.

Clones de bactérias de cultura de enriquecimento (7%) foram relacionados à degradação anaeróbia de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em cultura de enriquecimento de redutoras de sulfato.

Syntrophorhabdus aromaticivorans (*Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Syntrophobacterales; Syntrophorhabdaceae; Syntrophorhabdus*) foi descrito como parte de

cultura anaeróbia capaz de degradar fenol a acetato em associações sintróficas obrigatórias com metanogênicas hidrogenotróficas (QIU et al., 2008).

A filogenia bacteriana foi reconstruída a partir das sequências parciais do gene RNAr 16S do Domínio *Bacteria* obtidas na construção da biblioteca genômica para a amostra 19, coletada a partir da câmara anaeróbia do reator principal RA do sistema em escala piloto ao término da Condição C3 (Figura 5.19). Foram aplicados o método estatístico *Neighbor-joining* e o modelo de substituição *Maximum Composite Likelihood*.

A Tabela 5.4 apresenta os principais microrganismos detectados nos dois sistemas de reatores por meio de métodos biomoleculares aplicados nesta pesquisa (PCR/DGGE e sequenciamento, clonagem e sequenciamento de fragmento do gene RNAr 16S).

Figura 5.19 – Árvore filogenética baseada na sequência de nucleotídeos de fragmentos do gene RNAr 16S do Domínio Bacteria, revelando a relação entre os clones obtidos para a amostra 19 (Condição C3, reator desnitrificante em escala piloto). O padrão de ramificação foi gerado a partir do método de *Neighbor-joining* e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1000 árvores. A filogenia bacteriana foi reconstruída a partir de sequências parciais do gene RNAr 16S pelo método estatístico *Neighbor-joining*, utilizando o modelo de substituição *Maximum Composite Likelihood*. Os ramos terminais estão identificados por gênero ou espécie e com o número de acesso do *GenBank* da respectiva sequência. Os números nos ramos indicam os valores de *bootstrap*. A barra indica o número estimado de modificações por posição de nucleotídeo na sequência.

válida da distribuição relativa das espécies. Isto sugere que um ou ambos os métodos não são adequados para determinar a biodiversidade total, parâmetro que depende do número de diferentes espécies presentes e sua abundância relativa e distribuição (SANZ; KOCHILING, 2007).

5.2 Diversidade Morfológica das Comunidades Microbianas encontradas nos Reatores Desnitrificantes em Escalas Piloto e de Bancada

Os exames microbiológicos foram realizados com a orientação da Dra. Eloísa Pozzi. Foram realizados minuciosamente por meio de microscopia óptica comum de contraste de fase para amostras da primeira e segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto e ao término do período de incubação dos ensaios de NMP para bactérias desnitrificantes. Foram confeccionadas de 3 a 5 lâminas por amostra e analisados de 9 a 12 campos por lâmina. Dentre as principais morfologias detectadas, destacaram-se: bacilos, cocos, filamentos e morfologias semelhantes a bactérias redutoras de sulfato (Figuras 5.20, 5.21, 5.22 e 5.23).

Figura 5.20 – Imagem de microscopia óptica de amostra da primeira coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 30 dias do início de sua operação (aumento: 1000 vezes).

A Figura 5.20 apresenta imagem de microscopia óptica para amostra retirada na primeira coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 30 dias do início de sua operação, ao término da condição C1 (alimentação com 100% de efluente anaeróbio não nitrificado).

As Figuras 5.21 e 5.22 correspondem às morfologias encontradas para a amostra retirada na segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 60 dias do início de sua operação, ao término da condição C2 (alimentação por mistura composta de 20 – 30% de efluente anaeróbio e 70 – 80% de efluente nitrificado).

Figura 5.21 – Imagem de microscopia óptica de amostra da segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 60 dias do início de sua operação (aumento: 1000 vezes).

Figura 5.22 – Imagem de microscopia óptica de amostra da segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 60 dias do início de sua operação (aumento: 1000 vezes).

A Figura 5.23 apresenta imagem de microscopia óptica de alíquota retirada de um dos frascos da quintuplicata da diluição -5 do ensaio de NMP para desnitrificantes autotróficos após o período de incubação de 30 dias, inoculado com amostra da segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto (após 60 dias do início de sua operação, à conclusão da condição C2 – alimentação por mistura composta de 20 – 30% de efluente anaeróbio e 70 – 80% de efluente nitrificado).

É possível visualizar as formas bacilares presentes nessa preparação para microscopia óptica, esperadas para essa amostra. Ressalta-se a predominância desta morfologia bem como a seletividade exercida pelo meio de cultivo, favorecendo micro-organismos desnitrificantes autotróficos que comumente apresentam tal morfologia. Os pontos de maior refringência são característicos de grânulos de enxofre, igualmente esperados para a condição em que foram coletadas as amostras.

Figura 5.23 – Imagem de microscopia óptica de alíquota retirada de um dos frascos da quintuplicata da diluição -5 do ensaio de NMP para desnitrificantes autotróficos incubado a partir de amostra da segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto, após 60 dias do início de sua operação (aumento: 1000 vezes).

5.3 Caracterização da Biomassa Desnitrificante no Reator em Escala Piloto

A estimativa da densidade de populações bacterianas desnitrificantes heterotróficas visou à quantificação de micro-organismos viáveis capazes de promover a redução desassimilativa de nitrato utilizando compostos orgânicos como doadores de elétrons. A presença de populações desnitrificantes autotróficas que utilizam sulfeto como doador de elétrons foi verificada por meio de ensaios específicos para sua quantificação por NMP (modificados de Eckford e Fedorak, 2002 e *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* – APHA/AWWA, 2005), a partir de amostras coletadas do reator desnitrificante em escala piloto ao final de cada condição operacional em estudo (redução de nitrato com sulfeto em razão de $N/S = 1,86$).

Os resultados para NMP de desnitrificantes heterotróficas e desnitrificantes autotróficas por 100 mL da cultura estão expressos na Figura 5.24.

Figura 5.24 – NMP de bactérias desnitrificantes heterotróficas (amostragens 1 e 2) e desnitrificantes autotróficas (amostragem 3) em 100 mL da cultura realizadas a partir de lodo do reator desnitrificante em escala piloto ao término das condições C1 e C2. Amostragem 1: condição C1; amostragens 2 e 3: condição C2.

Observa-se que a densidade de populações microbianas desnitrificantes foi expressiva após o período de incubação dos ensaios, conforme visto na Figura 5.24. Os ensaios para NMP de bactérias desnitrificantes heterotróficas foram quantificadas no 14º dia após sua inoculação. Foram estimadas $9,2 \times 10^{19}$ bactérias desnitrificantes heterotróficas por 100 mL, para o ensaio realizado a partir de alíquota da primeira amostragem (ao término da condição C1, alimentação com 100% de efluente anaeróbio não nitrificado).

Para os ensaios referentes à segunda coleta de amostras (condição C2), o número estimado de bactérias desnitrificantes heterotróficas foi de $1,6 \times 10^{20} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$. Esses ensaios para NMP foram inoculados com amostras da segunda coleta do reator desnitrificante em escala piloto após 60 dias do início de sua operação, à conclusão da condição C2 (alimentação por mistura composta de 20 – 30% de efluente anaeróbio e 70 – 80% de efluente nitrificado).

A partir desses resultados, é possível afirmar que o reator nitrificante que compôs o sistema de reatores em escala piloto, inoculado apenas com esgoto sanitário, produziu efluente contendo densidade suficiente de micro-organismos redutores de nitrato. Pelo fato de ter sido utilizado como alimentação do reator desnitrificante, o referido efluente favoreceu o

estabelecimento e manutenção do processo de desnitrificação autotrófica nesse reator, bem como o enriquecimento desta biomassa ao longo das sucessivas etapas de operação do sistema, hipótese corroborada pelo aumento da concentração de micro-organismos na segunda amostragem.

Vale ressaltar que a redução de nitrato na condição de excesso de sulfeto é termodinamicamente mais favorável, o que justifica a obtenção de maior número de micro-organismos. Além disso, tal condição parece solucionar os problemas associados ao manuseio de sulfeto na forma de H_2S , altamente volátil, o que implica em perdas e consequente limitação do crescimento microbiano na condição N/S estequiométrica.

Apesar de a enumeração por NMP ser um método comum para avaliar a proporção de um grupo fisiológico de micro-organismos em um ecossistema específico, Etchebehere et al. (2001) alertaram para vieses característicos de métodos baseados em cultivo. Estes pesquisadores afirmaram que são necessários mais estudos aplicando técnicas moleculares para detectar a presença de micro-organismos que são não cultiváveis sob condições de enumeração, mas que, no entanto, contribuem para a atividade desnitrificante.

A comparação de populações associadas à digestão anaeróbia é um primeiro passo em direção a uma futura compreensão da relação entre biodiversidade, condições de operação e eficiência de reatores. Segundo Rivière et al. (2009), seu papel na digestão anaeróbia apresenta-se como fundamental à investigação. Como para a digestão anaeróbia, tal investigação com o objetivo de estabelecer as relações acima descritas é de fundamental importância para o processo de desnitrificação.

6 CONCLUSÕES

Houve seleção de populações bacterianas detectadas pela técnica de PCR/DGGE e, conseqüentemente, o número de bandas nos perfis foi reduzido ao longo do período de operação dos reatores desnitrificantes em escala de bancada e piloto. O mesmo fenômeno foi observado quando dos exames microscópicos, que refletiram a seletividade exercida pelo meio de cultivo e condições de crescimento impostas às culturas nos ensaios de enumeração por NMP que, por sua vez, revelaram maior densidade de populações desnitrificantes heterotróficas. As principais morfologias detectadas, bem como os pontos de maior refringência característicos de grânulos de enxofre, representaram forte indício da presença de micro-organismos associados à desnitrificação e ao ciclo do enxofre.

A associação de metodologias biomoleculares aplicadas neste estudo ofereceu um panorama da constituição da comunidade microbiana estabelecida nos reatores em estudo, fornecendo informações sobre gêneros predominantes e a dinâmica das populações em resposta a modificações ambientais. Os fragmentos do gene RNAr 16S obtidos por PCR/DGGE e posterior sequenciamento foram relacionados aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Clostridium*, *Cupriavidus* e *Ralstonia*. Filotipos dos clones obtidos para a amostra representativa da condição de operação C3 do reator desnitrificante em escala piloto, em que meio apresentou-se oxidado, com oxidação de sulfeto a sulfato, consumo de nitrogênio amoniacal e valores neutros ou positivos de potencial de óxido-redução foram associados a bactérias não cultiváveis provenientes de amostras ambientais com micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbia em reatores tratando água residuária, *Synergistetes*, *Firmicutes* envolvidos na digestão anaeróbia de lodo, *Deferribacteria* e *Proteobacteria*.

Resultados descritos na literatura corroboraram os dados obtidos neste estudo. *Chloroflexi* também foram encontrados em digestores localizados em plantas de tratamento de águas residuárias recebendo essencialmente efluente doméstico e *Propionibacterium* foi relacionada a comunidade microbiana de reatores UASB tratando água residuária industrial. Bactérias em associações sintróficas com participação no ciclo do enxofre e/ou na digestão anaeróbia foram igualmente identificadas: *Clostridium sulfidigenes* e outros *Firmicutes*, *Synergistetes*, clones de bactérias de cultura de enriquecimento e bactérias do gênero *Syntrophorhabdus*.

Foram identificados micro-organismos presentes nos reatores com reconhecida capacidade para desnitrificação: espécies do gênero *Pseudomonas*, *Desulfovibrio desulfuricans* e bactérias pertencentes ao gênero *Ralstonia*. Além disso, para a quase totalidade das amostras tomadas de ambos os reatores desnitrificantes em escala de bancada e piloto as reações de amplificação foram positivas, o que sugere a presença de bactérias semelhantes a *Thiomicrospira*. Para duas condições de operação do reator em escala de bancada foram identificados micro-organismos semelhantes a *Sulfurimonas denitrificans*, bactéria autotrófica redutora de nitrato e oxidadora de sulfeto.

Este foi o primeiro estudo microbiológico sobre o sistema de reatores em escala piloto misto e de alta complexidade concebido e operado por Souza (2011). Desta forma, tal trabalho de pesquisa apresentou caráter exploratório, partindo de metodologias microbiológicas e biomoleculares consagradas e bem estabelecidas de modo a obter o inventário e a quantificação dos grupos taxonômicos envolvidos na desnitrificação heterotrófica e autotrófica, na digestão aneróbia e nos demais processos que ocorreram simultaneamente no sistema.

7 SUGESTÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Para que sejam abordadas questões específicas relativas ao processo de desnitrificação em sistemas complexos com ocorrência de diversos processos simultaneamente, como aqueles a que se refere este estudo, gostaria de sugerir a realização de ensaios de atividade enzimática e investigação dos genes funcionais associado ao processo de interesse.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, S. B.; ZAIAT, M. (2008) Desempenho de reator anaeróbio-aeróbio de leito fixo no tratamento de esgoto sanitário. *Engenharia Sanitária Ambiental* **13** (2), 181-188.
- AHN, Y.H. (2006) Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry* **41**, 1709-1721.
- AKARSUBASI, A. T.; INCE, O.; OZ, N. A.; KIRDAR, B.; INCE, B. K. (2006) Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archaeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters. *Process Biochem* **41**(1), 28–35.
- ALFREIDER, A.; VOGT, C.; BABEL, W. (2002) Microbial Diversity in an *in situ* Reactor System Treating Monochlorobenzene Contaminated Groundwater as Revealed by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **25**, 232–240.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25** (17), 3389-3402.
- APHA/AWWA (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* Water Environmental Federation, Washington, DC.
- ARAÚJO JUNIOR, M. M. (2006). Reator combinado anaeróbio-aeróbio de leito fixo para remoção de matéria orgânica e nitrogênio de água residuária de indústria produtora de lisina. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.
- ARIESYADY, H. D.; ITO, T.; OKABE, S. (2007) Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Res.* **41**, 1554–1568.
- ARP, D. J.; CHAIN, P. S. G.; KLOTZ, M. G. (2007). The impact of genome analyses on our understanding of ammonia-oxidizing bacteria. *Ann Rev Microbiol* **61**, 503–528.
- ARRIGO, R. A. (2005) Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* **437**, 349–355.
- BAENA, S.; FARDEAU, M. L.; OLLIVIER, B.; LABAT, M.; THOMAS, P.; GARCIA, J. L.; PATEL, B. K. (1999) *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49** (3), 975-982.
- BANKS, R. G. S.; HENDERSON, R. J.; PRATT, J. M. (1968). Reaction of gases in solution. III. Some reactions of nitrous oxide with transition-metal complexes. *J. Chem. Soc. A* **1968**, 2886–2889.

- BARNS, S. M.; TAKALA, S. L.; KUSKE, C. R. (1999) Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1731–1737.
- BAUMANN, B.; SNOZZI, M.; ZEHNDER, A. J. B.; VAN DER MEER, J. R. (1996) Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.* **178**, 4367–4374.
- BEIJERINCK, M. W. (1904) Ueber die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können. *Centralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II* **11**, 593–599.
- BELL, L. C.; RICHARDSON, D. J.; FERGUSON, S. J. (1992) Identification of nitric oxide reductase activity in *Rhodobacter capsulatus*: the electron transport pathway can either use or bypass both cytochrome c2 and the cytochrome bc1 complex. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 437–443.
- BELLER, H.R.; CHAIN, P. S. G.; LETAIN, T.E.; CHAKICHERLA, A.; LARIMER, F. W.; RICHARDSON, P. M.; COLEMAN, M. A.; WOOD, A. P.; KELLY, D. P. (2006a) The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *J. Bacteriol.* **188** (4), 1473–1488.
- BELLER, H. R.; LETAIN, T. E.; CHAKICHERLA, A.; KANE, S. R.; LEGLER, T. C.; COLEMAN, M. A. (2006b) Whole-genome transcriptional analysis of chemolithoautotrophic thiosulfate oxidation by *Thiobacillus denitrificans* under aerobic versus denitrifying conditions. *J. Bacteriol.* **188** (19), 7005–7015.
- BERESCHENKO, L.A.; HEILIG, G.H.J.; NEDERLOF, M.M.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; STAMS, A.J.M.; EUVERINK, G.J.W. (2008) Molecular Characterization of the Bacterial Communities in the Different Compartments of a Full-Scale Reverse-Osmosis Water Purification Plant. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (17), 5297–5304.
- BRETTAR, I.; RHEINHEIMER, G. (1991). Denitrification in the central Baltic: evidence for H₂S-oxidation as motor of denitrification at the oxic–anoxic interface. *Mar. Ecol. – Prog. Ser.* **77**, 157–169.
- CALMELS, S.; OHSHIMA, H.; HENRY, Y.; BARTSCH, H. (1996) Characterization of bacterial cytochrome cd1-nitrite reductase as one enzyme responsible for catalysis of nitrosation of secondary amines. *Carcinogenesis* **17**, 533–536.
- CAMPOS, J. L.; CARVALHO, S.; PORTELA, R.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MENDEZ, R. (2007) Kinetics of denitrification using sulphur compounds: Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds. *Bioresource Technology* doi:10.1016/j.biortech.2007.02.007.
- CANTO, C. S. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2008) Feasibility of nitrification/denitrification in a sequencing batch biofilm reactor with liquid circulation applied to post-treatment. *Bioresource Technology* **99**, 644–654.

CARDINALI-REZENDE, J.; DEBARRY, R. B.; COLTURATO, L. F.; CARNEIRO, E. V.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. (2009) Molecular identification and dynamics of microbial communities in reactor treating organic household waste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84** (4), 777-789.

CARDOSO, R. B.; SIERRA-ALVAREZ, R.; ROWLETTE, P.; RAZO FLORES, E.; GOMEZ, J.; FIELD, J.A. (2006) Sulfide Oxidation by Chemolithoautotrophic Denitrification. *Biotechnology and Bioengineering*. DOI 10.1002/bit.

CHAIN, P.; LAMERDIN, J.; LARIMER, F.; REGALA, W.; LAO, V.; LAND, M.; HAUSER, L.; HOOPER, A.; KLOTZ, M.; NORTON, J.; SAYAVEDRA-SOTO, L.; ARCIERO, D.; HOMMES, N.; WHITTAKER, M.; ARP, D. (2003). Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **185**, 2759–2773.

CHOVATIA, M.; SIKORSKI, J.; SCHRODER, M.; LAPIDUS, A.; NOLAN, M.; TICE, H.; GLAVINA DEL RIO, T.; COPELAND, A.; CHENG, J. F.; LUCAS, S.; CHEN, F.; BRUCE, D.; GOODWIN, L.; PITLUCK, S.; IVANOVA, N.; MAVROMATIS, K.; OVCHINNIKOVA, G.; PATI, A.; CHEN, A.; PALANIAPPAN, K.; LAND, M.; HAUSER, L.; CHANG, Y. J.; JEFFRIES, C. D.; CHAIN, P.; SAUNDERS, E.; DETTER, J. C.; BRETTIN, T.; ROHDE, M.; GOKER, M.; SPRING, S.; BRISTOW, J.; MARKOWITZ, V.; HUGENHOLTZ, P.; KYRPIDES, N. C.; KLENK, H. P.; EISEN, J. A. (2009) Complete genome sequence of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* type strain (Su883). *Stand Genomic Sci* **1** (3), 254-261.

CHRISTENSEN, P. B.; RYSGAARD, S.; SLOTH, N. P.; DALSGAARD, T.; SCHWAERTER, S. (2000) Sediment mineralization, nutrient fluxes, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in an estuarine fjord with sea cage trout farms. *Aquat Microb Ecol* **21**(1), 73–84.

COFER, W. R.; III, LEVINE, J. S.; WINSTEAD, E. L.; STOCKS, B. J. (1991) New estimates of nitrous oxide emissions from biomass burning. *Nature* **349**, 689–691.

CONRAD, R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol. Rev.* **60**, 609–640.

COSTA, C.; MACEDO, A.; MOURA, I.; MOURA, J. J. G. ; LEGALL, J.; BERLIER, Y.; LIU, M.-Y.; PAYNE, W. J. (1990) Regulation of the hexaheme nitrite/nitric oxide reductase of *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes* and *Escherichia coli*. A mass spectrometric study. *FEBS Lett.* **276**, 67–70.

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5116–5122.

CUADRADO, V., GOMILA, M., MERINI, L., GIULIETTI, A. M., MOORE, E. R. (2010) *Cupriavidus pampae* sp. nov., a novel herbicide-degrading bacterium isolated from agricultural soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60** (PT 11), 2606-2612.

- DE BOK, F. A. M.; VAN LEERDAM, R. C.; LOMANS, B. P.; SMIDT, H.; LENS, P. N. L.; JANSSEN, A. J. H.; STAMS, A. J. M. (2006) Degradation of methanethiol by methylotrophic methanogenic archaea in a lab scale upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied Environmental Microbiology* **72** (12), 7540 - 7547.
- DIAZ, E. E.; STAMS, A. J. M.; AMILS, R.; SANZ, J. L. (2006) Phenotypic Properties and Microbial Diversity of Methanogenic Granules from a Full-Scale Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor Treating Brewery Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (7), 4942–4949.
- DIAZ, C.; BAENA, S.; PATEL, B. (2008) Peptidolytic microbial community of two modified UASB reactors of the brewery industries. Direct Submission. Submitted (05-AUG-2008) Biology Dept., Pontificia Universidad Javeriana, Cra 7 No. 40-62, Bogota 01, Colombia.
- DICKINSON, R. E.; CICERONE, R. J. (1986) Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature* **319**, 109–115.
- DUCE, R. A.; LAROCHE, J.; ALTIERI, K.; ARRIGO, K. R.; BAKER, A. R.; CAPONE, D. G.; CORNELL, S.; DENTENER, F.; GALLOWAY, J.; GANESHRAM, R. S.; GEIDER, R. J.; JICKELLS, T.; KUYPERS, M. M.; LANGLOIS, R.; LISS, P. S.; LIU, S. M.; MIDDELBURG, J. J.; MOORE, C. M.; NICKOVIC, S.; OSCHLIES, A.; PEDERSEN, T.; PROSPERO, J.; SCHLITZER, R.; SEITZINGER, S.; SORESENSEN, L. L.; UEMATSU, M.; ULLOA, O.; VOSS, M.; WARD, B.; ZAMORA, L. (2008). Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean. *Science* **320**, 893–897.
- DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Editors) (2006) The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Volume 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. New York: Springer.
- ECKFORD, R. E., FEDORAK, P. M. (2002) Planktonic nitrate-reducing bacteria and sulfate-reducing bacteria in some western Canadian oil field waters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **29**, 83–92.
- EISENMANN, E.; BEUERLE, J.; SULGER, K.; KRONECK, P. M.; SCHUMACHER, W. (1995) Lithotrophic growth of *Sulfurospirillum deleyianum* with sulfide as electron donor coupled to respiratory reduction of nitrate to ammonia. *Arch. Microbiol.* **164**(3), 180–185.
- ETCHEBEHERE, C.; ERRAZQUIN, I.; BARRANDEGUY, E.; DABERT, P.; MOLETTA, R.; MUXÍ, L. (2001) Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. *FEMS Microbiology Ecology* **35** (3), 259–265.
- ETTWIG, K. F.; SHIMA, S.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; KAHNT, J.; MEDEMA, M. H.; OP DEN CAMP, H. J. M.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. (2008). Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environ. Microbiol.* **10**, 3164–3173.

FERNANDEZ, N.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J. A.; AMILS, R.; SANZ, J. L. (2007) Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.062.

FERRIS, M. J.; G. 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.

FISCHER, S. G., LERMAN, L. S. (1980) Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 4420–4424.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; VALLERO, M. (2006) Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: Consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology* **5**, 3 – 19.

FREEMAN, S.A.; SIERRA-ALVAREZ, R.; ALTINBAS, M.; HOLLINGSWORTH, J.; STAMS, A. J. M.; SMIDT, H. (2008) Molecular characterization of mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors. *Biodegradation* **19**, 161–177.

GALLOWAY, J. N.; TOWNSEND, A. R.; ERISMAN, J. W.; BEKUNDA, M.; CAI, Z. C.; FRENEY, J. R.; MARTINELLI, L. A.; SEITZINGER, S. P.; SUTTON, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* **320**, 889–892.

GEVERTZ D, TELANG, A. J., VOORDOUW, G., JENNERMAN, G. (2000) Isolation and characterization of strains CVO and FWKO B, two novel nitrate -reducing, sulfide - oxidizing bacteria isolated from oil field brine. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2491–2501.

GREEN, S. J., LEIGH, M. B., NEUFELD, J. D. (2009) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. Pages 4137–4158 in: Timmis, K.N. (Ed) *Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds*. Springer (Heidelberg, Germany).

GRIFFIN, B. M.; SCHOTT, J.; SCHINK, B. (2007) Nitrite, an electron donor for anoxygenic photosynthesis. *Science* **316**, 1870.

GRIFFITHS, R. I., WHITELEY, A. S., O'DONNELL, A. G., BAILEY, M. J. (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 5488–5491.

HAO, X. D.; HEIJNEN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. (2002) Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification–ANAMMOX biofilm process. *Water Res.* **36**, 4839–4849.

HÄGGBLOM, M. M.; RIVERA, M. D.; YOUNG, L. Y. (1996) Anaerobic degradation of halogenated benzoic acids coupled to denitrification observed in a variety of sediment and soil samples. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**, 213–219.

HÖFLE, M. G.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R.; BÖTEL, J.; LABRENZ, M.; BRETTAR, I. (2005) Retrieval of nearly complete 16S rRNA gene sequences from environmental DNA following 16S rRNA-based community fingerprinting. *Environmental Microbiology* **7** (5), 670–675.

HOLM, R. H. (1987) Metal-centered oxygen atom transfer reactions. *Chem. Rev.* **87**, 1401–1449.

HUANG, H., PAN, X., WEI, C. (2010) Isolation and Identification of thiocyanate utilizing chemolithotrophs from coking wastewater. (Direct Submission; Submitted (02-MAR-2010) College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, East of Wai Huai Road No.382, Guangzhou, Guangdong 510006, China).

HUETTEL, M.; FORSTER, S.; KLOSER, S.; FOSSING, H. (1996) Vertical migration in the sediment-dwelling sulfur bacteria *Thioploca* spp. in overcoming diffusion limitations. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(6), 1863–1872.

HULSHOFF POL, L. W.; LENS, P. N. L.; STAMS, A. J. M.; LETTINGA, G. (1998) Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation* **9**, 213–224.

IAMAMOTO, C. Y. (2006). Remoção de nitrogênio de águas residuárias com elevada concentração de nitrogênio amoniacal em reator contendo biomassa em suspensão operado em bateladas sequenciais e sob aeração intermitente. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

ISE, K.; SUTO, K.; INOUE, C. (2011) Microbial Diversity and Changes in the Distribution of Dehalogenase Genes during Dechlorination with Different Concentrations of cis-DCE. *Environ. Sci. Technol.* **45** (12), 5339–5345.

JETTEN, M. S. M. (2008) The microbial nitrogen cycle. *Environ. Microbiol.* **10**, 2903–2909.

JETTEN, M. S. M.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; SCHALK, J.; VAN DONGEN, U. G.; VAN DE GRAAF, A. A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C.; KUENEN, J. G. (1998). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 421–437.

JETTEN, M. S. M.; VAN NIFTRIK, L.; STROUS, M.; KARTAL, B.; KELTJENS, J. T.; OP DEN CAMP, H. J. M. (2009) Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **44**(2–3), 65–84.

JORGENSEN, B. B.; NELSON, D. C. (2004) Sulfide oxidation in marine sediments: geochemistry meets microbiology. In: Amend JP, Edwards KJ, Lyons TW (eds) Sulfur biogeochemistry—past and present. Geological Society of America, Colorado, pp 63–81.

JUVONEN, R.; SUIHKO, M. L. (2006) *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56** (4), 695-702.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. (1997) Nitrate removal from drinking water—review. *J. Environ. Eng.-ASCE* **123**, 371–380.

KARTAL, B.; KUYPERS, M. M. M.; LAVIK, G.; SCHALK, J.; CAMP, H. J. M. O.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. (2007) Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environmental Microbiology* **9**(3), 635–642.

KERSTERS, I., VERSTRAETE, W. (1996) Inactivation of *Aeromonas hydrophila* by Fe(II)-Related-Radical Generation in Oxidizing Groundwaters. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (9), 3277 – 3283.

KIM, C.-H.; HOLLOCHER, T. C. (1984) Catalysis of nitrosyl transfer reactions by a dissimilatory nitrite reductase (cytochrome cd1). *J. Biol. Chem.* **259**, 2092–2099.

KIM, K.-R.; CRAIG, H. (1993) Nitrogen-15 and oxygen-18 characteristics of nitrous oxide: a global perspective. *Science* **262**, 1855–1857.

KINDAICHI, T.; ITO, T.; OKABE, S. (2004) Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1641–1650.

KLEEREBEZEM, R.; MENDEZ, R. (2002) Autotrophic denitrification for combined hydrogen sulfide removal from biogas and post-denitrification. *Water Science and Technology* **45** (10), 349–356.

KNOWLES, R. (1982) Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46** (1), 43-70.

KOENIG, A.; ZHANG, T.; LIU, L. H.; FANG, H. H. P. (2005) Microbial community and biochemistry process in autosulfurotrophic denitrifying biofilm. *Chemosphere* **58**, 1041–1047.

KOENNEKE, M.; BERNHARD, A. E.; DE LA TORRE, J. R.; WALKER, C. B.; WATERBURY, J. B.; STAHL, D. A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**, 543–546.

KUENEN, J. G. (2008) Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 320 – 326.

LAM, P.; JENSEN, M. M.; LAVIK, G.; MCGINNIS, D. F.; MULLER, B.; SCHUBERT, C. J.; AMANN, R.; THAMDRUP, B.; KUYPERS, M. M. M. (2007). Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 7104–7109.

- LAKANIEMI, A.-M.; HULATT, C. J.; THOMAS, D. N.; TUOVINEN, O. H.; PUHAKKA, J. A. (2011) Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. *Biotechnology for Biofuels* **4**, 34.
- LANE, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (eds). Chichester, UK: John Wiley & Sons, pp. 115–175.
- LAPARA, T. M.; NAKATSU, C. H.; PANTEA, L.; ALLEMAN, J. E. (2000) Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3951–3959.
- LAYTON, A. C.; KARANTH, P. N.; LAJOIE, C. A.; MEYERS, A. J.; GREGORY, I. R.; STAPLETON, R.D. (2000) Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1167–1174.
- LEE, H. W.; PARK, Y. K.; CHOI, E.; LEE, J. W. (2008) Bacterial Community and Biological Nitrate Removal: Comparisons of Autotrophic and Heterotrophic Reactors for Denitrification with Raw Sewage. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **18** (11), 1826–1835.
- LI, D.; YANG, M.; ZHANG, J. (2008) Bacterial community structures under the selection pressure of high levels of antibiotics. Direct Submission. Submitted (03-JUL-2008) The Chinese Academy of Sciences, Research Center for Eco-environmental Science, ShuangQing Road #18, Haidian District, Beijing 100085, China.
- LI, N., NIE, P. (2009) Research on the pathogens in *Ctenopharyngodon idellus* (Direct Submission; Submitted (23-NOV-2009) Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, No. 7 Donghu South Road, Wuchang District, Wuhan, Hubei 430072, China.
- LIU, J.; WU, W.; CHEN, C.; SUN, F.; CHEN, Y. (2011) Prokaryotic diversity, composition structure, and phylogenetic analysis of microbial communities in leachate sediment ecosystems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91** (6), 1659–1675.
- LOUBINOX, J.; MORY, F.; PEREIRA, I. A.; LE FAOU, A. E. (2000) Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38** (2), 931–934.
- MAHMOOD, Q.; ZHENG, P.; CAI, J.; WU, D.; HU, B.; LI, J. (2007) Anoxic sulfide biooxidation using nitrite as electron acceptor. *Journal of Hazardous Materials* **147**, 249–256.
- MAITY, J. P., LIU, C.-C., JEAN, J.-S. (2009) Geochemical characterization of mud volcano and hot spring Taiwan (Direct Submission; Submitted (09-DEC-2009) Earth Science, National Cheng Kung University, 1 University Road, Tainan 70101, Taiwan)
- MANCONI, I.; CARUCCI, A.; LENS, P. (2007) Combined Removal of Sulfur Compounds and Nitrate by Autotrophic Denitrification in Bioaugmented Activated Sludge System. *Biotechnology and Bioengineering* **98** (3), 551–560.

- MARTINEZ-MURCIA, A. J., SAAVEDRA, M. J., MOTA, V. R., MAIER, T., STACKEBRANDT, COUSIN, S. (2008) *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58** (PT 5), 1169-1175.
- MEHTA, M. P; BAROSS, J. A. (2006) Nitrogen fixation at 92°C by a hydrothermal vent archaeon. *Science* **314**, 1783–1786.
- MESSING, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**, 20–78.
- MEYER, O.; FRUNZKE, K.; GADKARI, D.; JACOBITZ, S.; HUGENDIECK, I.; KRAUT, M. (1990) Utilization of carbon monoxide by aerobes: recent advances. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 253–260.
- MORAES, B. S. (2012) Desnitrificação autotrófica com o uso de sulfeto e integração com o processo de nitrificação em um único reator. 285f. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- MOROTOMI, M.; NAGAI, F.; SAKON, H.; TANAKA, R. (2008) *Dialister succinatiphilus* sp. nov. and *Barnesiella intestinihominis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58** (12), 2716-2720.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (3), 695-700.
- MUYZER, G.; TESKE, A.; WIRSEN, C.; JANNASCH, H. (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164**, 165–172.
- MUYZER, G.; STAMS, A. J. M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews Microbiology* **6**, 441 – 454.
- MYERS, R., FISCHER, S., LERMAN, L., MANIATIS, T. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC- clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **13**, 3131-3145.
- NAKATSU, C. H. (2007) Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Science Society American Journal* **71** (2), 562–571, 2007
- NIELSEN, A. T., LIU, W. T., FILIPE, C., GRADY Jr, L., MOLIN, S., STAHL, D. A. (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1251-1258.
- NOLD, S. C., PANGBORN, J. B., ZAJACK, H. A., KENDALL, S. T., REDISKE, R. R., BIDDANDA, B. A. (2010) Benthic bacterial diversity in submerged sinkhole ecosystems. *Applied Environmental Microbiology* **76** (1), 347-351.

OKABE, S.; ODAGIRI, M.; ITO, T.; SATOH, H. (2007) Succession of Sulfur-Oxidizing Bacteria in the Microbial Community on Corroding Concrete in Sewer Systems. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (3), 971–980.

OTTE, S.; GROBBEN, N. G.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. (1996) Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2421–2426.

OTTE, S.; KUENEN, J. G.; NIELSEN, L. P.; PAERL, H. W.; ZOPFI, J., SCHULZ, H. N.; TESKE, A.; STROTMANN, B.; GALLARDO, V. A.; JORGENSEN, B. B. (1999) Nitrogen, carbon, and sulfur metabolism in natural Thioploca samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(7), 3148–3157.

PANICHNUMSIN, P.; CHAIPRASERT, P.; AHRING, B. K.; NOPHARATANA, A. (2009) Direct Submission Submitted (06-AUG-2009) Excellent Center of Waste Utilization and Management, King Mongkut's University of Technology Thonburi, 83 Moo 8, Thakham, Bangkhuntien, Bangkok 10150, Thailand.

PANTOJA FILHO, J. L. R. (2011) Remoção de matéria orgânica carbonácea e nitrogênio em reator anaeróbio – anóxico de leito fixo (RAALF) aplicado ao pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

PARK, C.-Y.; HONG, S.-W.; CHOI, Y.-S. (2007) Direct Submission Submitted (17-DEC-2007) Center for Environmental Technology Research, Korea Institute of Science and Technology, 39-1, Hawolgok-Dong, Sungbuk-Gu, Seoul 136-791, Korea.

PEREZ, R.; GALI, A.; DOSTA, J.; MATA-ALVAREZ, J. (2007) Biological Nitrogen Removal (BNR) Using Sulfides for Autotrophic Denitrification in a Sequencing Batch Reactor (SBR) To Treat Reject Water. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **46**, 6646-6649.

PERKINS, S. D.; GARCIA, M. L.; ANGENENT, L. T. (2009) Improving Stability of Anaerobic Digesters for Animal Waste Treatment. Direct Submission. Submitted (07-MAY-2009) Department of Biological and Environmental Engineering, Cornell University, 214 Riley-Robb Hall, Ithaca, NY 14853, USA.

PHILIPPOT L (2005) Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochem Soc Trans* **33**, 200–204.

QIU, Y. L.; HANADA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y.; SEKIGUCHI, Y. (2008) *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (7), 2051-2058

QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S. C.; TREUSCH, A. H.; ECK, J.; SCHLEPER, C. (2003) Acidobacteria form a coherent but highly diverse group

within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology* **50**(2), 563–575.

RAGHOEBARSING, A. A.; POL, A.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; SMOLDERS, A. J. P.; ETTWIG, K. F.; RIJPSTRA, W. I. C.; SCHOUTEN, S.; DAMSTÉ, J. S.; OP DEN CAMP, H. J. M.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**, 918–921.

RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; CAMARGO, E.F.M.; ZAIAT, M.; BORZANI, W. (2000) Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. *Bioresource Technology* **75** (2), 127 – 132.

REYES-AVILA, J., RAZO-FLORES, E., GOMEZ, J. (2004) Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research* **38**, 3313–3321.

RISGAARD-PETERSEN, N.; LANGEZAAL, A. M.; INGVARDSSEN, S.; SCHMID, M. C.; JETTEN, M. S. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; DERKSEN, J. W.; PIÑA-OCHOA, E.; ERIKSSON, S. P.; NIELSEN, L. P.; REVSBECH, N. P.; CEDHAGEN, T.; VAN DER ZWAAN, G. J. (2006). Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* **443**, 93–96.

RIVIERE, D.; DESVIGNES, V.; PELLETIER, E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBACH, J.; LI, T.; CAMACHO, P.; SGHIR, A. (2009) Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *The ISME Journal* **3**, 700–714.

ROEST, K.; ALTINBAS, M.; PAULO, P.L.; HEILIG, H.G.H.J.; AKKERMANS, A.D.L.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M.; STAMS, A.J.M. (2005) Enrichment and Detection of Microorganisms Involved in Direct and Indirect Methanogenesis from Methanol in an Anaerobic Thermophilic Bioreactor. *Microbial Ecology* **50**, 440–446.

SAIKI, R. K., BUGAWAN, T. L., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163–166.

SAITOU, N.; NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406 - 425.

SALLAM, A.; STEINBUCHER, A. (2009) *Clostridium sulfidigenes* sp. nov., a mesophilic, proteolytic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium isolated from pond sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 1661–1665.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANZ, J. L., KOCHLING, T. (2007) Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* **42**, 119–133.

- SARTI, A.; VIEIRA, L. G. T; FORESTI, E., ZAIAT, M. (2001) Influence of the liquid-phase mass transfer on the performance of a packed-bed bioreactor for wastewater treatment, *Bioresour Technol* **31**, 1760–1766
- SARTI, A.; POZZI, E.; CHINALIA, F. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2006) The performance of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating domestic sewage colonized by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemosphere* **62**, 1437–1443.
- SAYEH, R.; BIRRIEN, J.; HAMDI, M.; PRIEUR, D. (2009) *Thermoanaerovibrio* sp. nov, a novel member of the synergistales, isolated from a geothermal hot spring in Tunisia. Direct Submission Submitted (12-OCT-2009) Sayeh R., LM2E, UMR6197, UBO-CNRS-IFREMER, Iuem, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzane, Brest, FRANCE.
- SCALA, D. J.; KERKHOF, L. J. (1998). Nitrous oxide reductase (*nosZ*) genespecific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 61–68.
- SCALA, D. J.; KERKHOF, L. J. (1999). Diversity of Nitrous Oxide Reductase (*nosZ*) Genes in Continental Shelf Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (4), 1681–1687.
- SEKIGUCHI, Y.; TAKAHASHI, H.; KAMAGATA, Y.; OHASHI, A.; HARADA, H. (2001) In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green nonsulfur bacteria, subdivision I. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5740–5749.
- SELESI, D.; JEHLICH, N.; VON BERGEN, M.; SCHMIDT, F.; RATTEI, T.; TISCHLER, P.; LUEDERS, T.; MECKENSTOCK, R. U. (2010) Combined genomic and proteomic approaches identify gene clusters involved in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation in the sulfate-reducing enrichment culture N47. *J. Bacteriol.* **192** (1), 295–306.
- SHAO, M. -F.; ZHANG, T.; FANG, H. H. -P. (2010) Sulfur-driven autotrophic denitrification: diversity, biochemistry, and engineering applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**, 1027–1042.
- SIERRA-ALVAREZ, R.; BERISTAIN-CARDOSO, R.; SALAZAR, M.; GOMEZ, J.; RAZO-FLORES, E.; FIELD, J.A. (2007) Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment. *Water Research* **41**, 1253–1262.
- SIEVERT, S. M.; SCOTT, K. M.; KLOTZ, M. G.; CHAIN, P. S. G.; HAUSER, L. J.; HEMP, J.; HUGLER, M.; LAND, M.; LAPIDUS, A.; LARIMER, F. W.; LUCAS, S.; MALFATTI, S. A.; MEYER, F.; PAULSEN, I. T.; REN, Q.; SIMON, J. (2008) Genome of the epsilonproteobacterial chemolithoautotroph *Sulfurimonas denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** (4), 1145–1156.
- SONG, B. K.; PALLERONI, N. J.; HÄGGBLUM, M. M. (2000) Isolation and characterization of diverse halobenzoatedegrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3446–3453.

SONG, H.; LI, Z.; DU, B.; WANG, G.; DING, Y. (2012) Bacterial communities in sediments of the shallow Lake Dongping in China. *J. Appl. Microbiol.* **112** (1), 79-89.

SOROKIN, D. Y.; TOUROVA, T. P.; BRAKER, G.; MUYZER, G. (2007a) *Thiohalomonas denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Thiohalomonas nitratreducens* sp. nov., novel obligately chemolithoautotrophic, moderately halophilic, thiodenitrifying Gammaproteobacteria from hypersaline habitats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57** (7), 1582-1589.

SOUSA, D. Z.; PEREIRA, M. A.; SMIDT, H.; STAMS, A. J. M.; ALVES, M. M. (2007) Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**, 252-265.

SOUZA, T. S. O. (2011). Desnitrificação autotrófica usando sulfeto como doador de elétrons para remoção de nitrogênio de efluentes de reatores anaeróbios utilizados no tratamento de esgotos sanitários. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. Recuperado em 2011-07-22, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-23052011-091419>.

STARKENBURG, S. R.; CHAIN, P. S.; SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; HAUSER, L.; LAND, M. L.; LARIMER, F. W.; MALFATTI, S. A.; KLOTZ, M. G.; BOTTOMLEY, P. J.; ARP, D. J.; HICKEY, W. J. (2006). Genome sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2050-2063.

STEIN, L. Y.; ARP, D. J.; BERUBE, P. M.; CHAIN, P. S. G.; HAUSER, L.; JETTEN, M. S. M.; KLOTZ, M. G.; LARIMER, F. W.; NORTON, J. M.; OP DEN CAMP, H. J. M.; SHIN, M.; WEI, X. (2007) Whole-genome analysis of the ammoniaoxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation. *Environ. Microbiol.* **9**, 2993-3007.

STRAUB, K. L.; BENZ, M.; SCHINK, B.; WIDDEL, F. (1996) Anaerobic, nitrate dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1458-1460.

STROUS, M.; FUERST, J. A.; KRAMER, E. H. M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; WEBB, R.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**, 446-449.

STROUS, M.; JETTEN, M. S. M. (2004) Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 99-117.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28** (10), 2731-2739.

THIEMENS, M. H.; TROGLER, W. C. (1991) Nylon production: an unknown source of atmospheric nitrous oxide. *Science* **251**, 932-934.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.

TIEDJE, J. M. Denitrification. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (1982) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2 ed. Madson, Wisconsin: USA, pp. 1011 – 1026.

TOSQUES, I. E.; SHI, J.; Shapleigh, J. P. (1996) Cloning and characterization of *nnrR*, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **178**(16), 4958–4964.

VAIOPOULOU, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. (2005) Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification. *Water Research* **39**, 4101–4109.

VAN LEERDAM, R. C.; BONILLA-SALINAS, M.; DE BOK, F. A. M.; BRUNING, H.; LENS, P. N. L.; STAMS, A. J. M.; JANSSEN, A. J. H. (2008a) Anaerobic Methanethiol Degradation and Methanogenic Community Analysis in an Alkaline (pH 10) Biological Process for Liquefied Petroleum Gas Desulfurization. *Biotechnology and Bioengineering* **101** (4), 691 – 701.

VAN LEERDAM, R.C.; DE BOK, F.A.M.; BONILLA-SALINAS, M.; VAN DOESBURG, W.; LOMANS, B. P.; LENS, P. N. L.; STAMS, A. J. M.; JANSSEN, A. J. H. (2008b) Methanethiol degradation in anaerobic bioreactors at elevated pH (P8): Reactor performance and microbial community analysis. *Bioresource Technology* **99**, 8967–8973.

VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; VAZOLLER, R. F.; FORESTI, E. (1997) Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reactor. *Applied Microbiology Biotechnology* **48**, 534 – 538.

VARGAS, C.; SONG, B.; CAMPS, M.; HÄGGBLÖM, M. M. (2000) Anaerobic degradation of fluorinated aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 342–347.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. (2007). The division ‘Synergistes’. *Anaerobe* **13**, 99–106.

WANG, F.; CHAPMAN, P. (1999) Biological implications of sulfide in sediment—a review focusing on sediment toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* **18** (11), 2526–2532.

WANG, X.; ZHU, Y.; YANG, J.; CHEN, X. (2008) Phylogenetic diversity of dissimilatory ferric iron reducers in arsenic contaminated paddy soil of Hunan, south China. Direct Submission. Submitted (28-SEP-2008) Soil Science Lab, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, 18 Shuangqing Road, Haidian District, Beijing 100085, China.

WEELINK, S. A. B.; TAN, N. C. G.; TEN BROEKE, H.; VAN DOESBURG, W.; LANGENHOFF, A. M.; GERRITSE, J.; STAMS, A. J. M. (2007) Physiological and phylogenetic characterization of a stable benzene-degrading, chlorate-reducing microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 312–321.

WINTZINGERODE, F. V.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 213–229.

TELANG, A. J., JENNEMAN, G. E., VOORDOUW, G. (1999) Sulfur cycling in mixed cultures of sulfide-oxidizing and sulfate- or sulfur-reducing oil field bacteria. *Can. J. Microbiol.* **45**, 905–913.

YOOSEPH, S.; SUTTON, G.; RUSCH, D. B.; HALPERN, A. L.; WILLIAMSON, S. J.; REMINGTON, K.; EISEN, J. A.; HEIDELBERG, K. B.; MANNING, G.; LI, W.; JAROSZEWSKI, L.; CIEPLAK, P.; MILLER, C. S.; LI, H.; MASHIYAMA, S. T.; JOACHIMIAK, M. P.; VAN BELLE, C.; CHANDONIA, J. M.; SOERGEL, D. A.; ZHAI, Y.; et al. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Expanding the universe of protein families. *PLOS Biology* **5**, 432–466.

ZAHID, M., ALI, S., ABBASI, M. K., HAMEED, S. (2010) Isolation and characterization of maize associated plant growth promoting bacteria (Direct Submission; Submitted (09-NOV-2010) TSD, NIBGE, Jhang Road, Faisalabad, Punjab 38000, Pakistan).

ZHANG, D.-C., MARGESIN, R. (2010) Phylogenetic analysis of cultured bacteria isolated from hydrocarbon-contaminated soil (Direct Submission; Submitted (08-NOV-2010) Institute of Microbiology, University of Innsbruck, Technikerstrasse 25, Innsbruck, Tyrol A-6020, Austria).

ZHANG, M.; ZHANG, T.; SHAO, M. F.; FANG, H. H. P. (2009) Autotrophic denitrification in nitrate-induced marine sediment remediation and *Sulfurimonas denitrificans*-like bacteria. *Chemosphere* **76**, 677–682.

ZIV-EL, M.; DELGADO, A. G.; YAO, Y.; KANG, D. W.; NELSON, K. G.; HALDEN, R. U.; KRAJMALNIK-BROWN, R. (2011) Development and characterization of DehaloR², a novel anaerobic microbial consortium performing rapid dechlorination of TCE to ethane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92** (5), 1063–1071.

ZUMFT, W. G.; CARDENAS, J. (1979) The inorganic biochemistry of nitrogen. Bioenergetic processes. *Naturwissenschaften* **66**, 81–88.

ZUMFT, W. G.; BRAUN, C.; CUYPERS, H. (1994) Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*: primary structure and gene organization of a novel bacterial cytochrome bc complex. *Eur. J. Biochem.* **219**, 481–490.

ZUMFT, W. G. (1997) Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61** (4), 533–616.