UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

FABIANA MESTRINELLI

Isolamento e caracterização de microrganismo envolvido na desnitrificação autotrófica pela oxidação de sulfeto em reator vertical de leito fixo.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Eugenio Foresti

São Carlos/SP

Outubro 2010

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 Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

M586i

Mestrinelli, Fabiana
Isolamento e caracterização de microrganismo envolvido na desnitrificação autotrófica pela oxidação de sulfeto em reator vertical de leito fixo / Fabiana Mestrinelli ; orientador Eugenio Foresti. -- São Carlos, 2010.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

1. *Pseudomonas stutzeri*. 2. Bactérias oxidadoras de sulfeto. 3. NMP. 4. PCR/DGGE. 5. Sequenciamento do gene rRNA 16S. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Bacharel **FABIANA MESTRINELLI**

Dissertação defendida e julgada em 15.10.2010 perante a Comissão Julgadora:

Aprovado

Prof. Titular **EUGENIO FORESTI – (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof^{a}. Dr^{a}. **MARIA BERNADETE AMANCIO VARESCHE SILVA**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Dr. **ARTUR LUIZ DA COSTA DA SILVA**
(Universidade Federal do Pará/UFPA)

Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Prof. Titular **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

Aos meus pais...

... Provedores e incentivadores da minha educação, por todo o apoio, carinho e amor incondicionais, presentes em todos os momentos da minha vida, e sem os quais eu não chegaria a lugar nenhum...

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Eugenio Foresti, pela orientação, confiança e oportunidade de realização deste trabalho, por compreender minhas dificuldades e me ajudar a superá-las;

À Professora Dra. Maria Bernadete Varesche, pelo apoio e disponibilidade constantes, pelas sugestões e contribuições para este trabalho;

À Dra. Flavia Talarico Saia, pela colaboração em todas as etapas deste trabalho;

À Dra. Eloisa Pozzi pelas sugestões no exame de qualificação, pelo interesse e pela ajuda na etapa experimental;

À Dra. Isabel Kimiko Sakamoto e ao Tiago Palladino, pela ajuda nas análises de Biologia Molecular;

À amiga Carolina Zampol Lazaro, pelo exemplo de dedicação, pela companhia e pelas valiosas dicas e sugestões;

Ao meu querido Luis, pelo interesse e ajuda no entendimento das equações e na obtenção dos gráficos.

Aos amigos Daniel, Mariana, Rafael, Tiago e Dagoberto, pelo carinho e pela ajuda. Aos colegas do LPB e à minha turma de mestrado.

À CAPES, pela bolsa concedida.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais retorna ao seu tamanho original"

Albert Einstein

RESUMO

MESTRINELLI, F. **Isolamento e caracterização de microrganismo envolvido na desnitrificação autotrófica pela oxidação de sulfeto em reator vertical de leito fixo.** Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a comunidade envolvida na desnitrificação autotrófica pela oxidação de sulfetos, aplicada ao pós-tratamento de efluentes anaeróbios. O enriquecimento da comunidade bacteriana e da comunidade desnitrificante autotrófica foi realizado a partir de amostras da biomassa coletadas de três reatores verticais de leito fixo operados em condições distintas, sendo, redução autotrófica de nitrato, redução autotrófica de nitrito e redução autotrófica de nitrato com excesso de sulfeto. Após a determinação da melhor condição de enriquecimento, a cultura foi purificada, identificada por meio de ferramentas da biologia molecular e caracterizada quanto às melhores condições de crescimento. O enriquecimento foi bem sucedido com a biomassa dos três reatores. No entanto, a condição de redução de nitrato com relação N/S igual a 0,8 foi a que apresentou maior concentração de microrganismos desnitrificantes autotróficos. A bactéria isolada foi identificada como *Pseudomonas stutzeri*. A velocidade específica máxima de crescimento da cultura ($\mu_{máx}$) foi de 0,037 h^{-1}, com tempo de duplicação de 18,7 horas. O rendimento celular (Y) do composto nitrogenado foi de 0,15 gSSV. gN^{-1} e a velocidade de desnitrificação foi de aproximadamente 0,24 gN. $gSSV^{-1}$. h^{-1}. Os dados obtidos indicaram a viabilidade da aplicação da espécie isolada no processo de desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons.

Palavras-chave: *Pseudomonas stutzeri*, bactérias oxidadoras de sulfeto, NMP, PCR/DGGE, seqüenciamento do gene rRNA 16S.

ABSTRACT

Mestrinelli, F. **Isolation and characterization of a microorganism involved on autotrophic denitrification by sulfide oxidation in a vertical fixed-bed reactor.** MSc. Dissertation, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

The aim of this study was to evaluate the community involved on autotrophic denitrification by sulfide oxidation applied to the post-treatment of anaerobic effluents. The enrichment of the bacterial community and autotrophic denitrifier community was accessed in three immobilized bed reactors operated at the conditions of autotrophic reduction of nitrate, autotrophic reduction of nitrite and autotrophic reduction of nitrate under excess of sulfide. Following the determination of the best enrichment conditions, the culture was purified, identified by molecular biology tools and the best growth conditions were characterized. Enriched cultures were obtained for the three operational conditions, but the best condition for the growth of autotrophic denitrifiers microorganisms was at N/S ratio of 0,8. The isolated microorganism was identified as Pseudomonas stutzeri. The maximum specific growth rate ($\mu_{máx}$) was 0.037 h^{-1}, with a doubling time of 18.7 hours. The growth yield (Y) of nitrogen compound was 0.15 gSSV. gN^{-1} and the specific rate of nitrogen utilization was approximately 0.24 gN. $gSSV^{-1}$. h^{-1}. The results indicated the viability of application of this microorganism for autotrophic denitrification using sulfide as electron donor.

Keywords: *Pseudomonas stutzeri*, sulfide oxidizing microorganisms, MPN, PCR/DGGE, rRNA 16S gene sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das formas de sulfeto para diferentes valores de pH (Speece, 1983). 17

Figura 2. Fluxograma das etapas experimentais. _____ 23

Figura 3. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40-60 %) utilizando primers para o Domínio Bacteria, onde a amostra 1 corresponde ao inóculo dos reatores, a amostra 2 corresponde ao lodo do reator na condição de redução de nitrato utilizando sulfeto como doador de elétrons e a amostra 3 corresponde ao lodo do reator na condição de redução de nitrito utilizando sulfeto como doador de elétrons. _____ 44

Figura 4. NMP de células desnitrificantes autotróficas em 100 mL da cultura do inóculo e o lodo enriquecido dos reatores nas condições de redução autotrófica de nitrato e nitrito em diferentes relações N/S. _____ 46

Figura 5: Microscopia óptica de amostras dos reatores (Aumento de 2000x). Figuras 5a e 5b são amostras do reator operado na condição de redução de nitrato e excesso de sulfeto após um mês de operação. Figuras 5c e 5d são amostras da cultura purificada. Figuras 5e e e 5f são colorações de gram da cultura purificada. _____ 49

Figura 6. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40-60 %) utilizando primers para o Domínio Bacteria, onde a amostra 1 corresponde ao inóculo dos reatores, a amostra 2 corresponde ao lodo do reator na condição de redução de nitrato utilizando sulfeto como doador de elétrons e a amostra 3 corresponde ao lodo do reator na condição de redução de nitrito utilizando sulfeto como doador de elétrons e a amostra 4 corresponde à cultura purificada. _____ 50

Figura 7: Gráfico de variação do pH para diferentes concentrações de sulfeto de sódio hidratado. _____ 54

Figura 8: Curva-padrão de crescimento da cultura purificada em relação ao tempo. A curva foi ajustada ao modelo de Boltzmann, com coeficiente de correlação de 0,99. _____ 57

Figura 9: Representação gráfica da variação temporal da taxa específica de crescimento (μ_x). _____ 58

Figura 10: Variação temporal das concentrações de nitrogênio e sulfeto e formação de sulfato. _____ 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da água residuária sintética nitrificada. 26

Tabela 2. Composição da solução de micronutrientes. 26

Tabela 3. Concentrações teóricas dos doadores e receptores de elétrons nas diferentes condições avaliadas. 27

Tabela 4. Primers utilizados na reação de polimerase em cadeia (PCR). 30

Tabela 5. Programação do termociclador utilizado nas reações de amplificação. 30

Tabela 6. Composição do meio de cultura Zinder modificado. 33

Tabela 7. Componentes adicionados ao meio Zinder esterilizado. 34

Tabela 8. Composição da solução Zinder de micronutrientes. 35

Tabela 9. Parâmetros e metodologias das análises físico-químicas. 36

Tabela 10. Programação do termociclador para as reações de sequenciamento. 38

Tabela 11. Concentrações teóricas iniciais do ensaio para determinação da variação temporal dos substratos. 42

Tabela 12: Informação das seqüências obtidas a partir da cultura purificada (C) e da banda recortada do DGGE (B) com primers para o Domínio Bacteria em comparação com seqüências representadas na base de dados do GenBank. 51

Tabela 13: Média das triplicatas para as concentrações iniciais (C_o) e finais (C_f) de $N\text{-}NO_3^-$ e SSV para o cálculo da produção celular Y (g SSV. g N^{-1}). 55

Tabela 14: Valores de SSV obtidos nas triplicatas e SSV médio nos tempos de amostragem. 56

Tabela 15: Taxa específica de crescimento para cada intervalo de tempo da curva-padrão de crescimento. 58

LISTA DE ABREVIATURAS

DGGE- Eletroforese em gel de gradiente desnaturante;

DNA- Ácido desoxirribonucléico;

NMP- Número Mais Provável;

PCR- Reação em cadeia da polimerase;

RNA- Ácido ribonucléico;

rRNA- RNA ribossomal;

SDT- Sulfetos dissolvidos totais;

SSV- Sólidos solúveis voláteis.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO---------- 11

2. OBJETIVOS---------- 13

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ---------- 14

3.1. O PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES ANAERÓBIOS---------- 14

3.2. REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO---------- 14

3.4. DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA UTILIZANDO SULFETO COMO DOADOR DE ELÉTRONS ---------- 18

3.5. DESNITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA A PARTIR DA REDUÇÃO DE NITRITO ---------- 20

3.6. MICRORGANISMOS DESNITRIFICANTES OXIDADORES DE SULFETO ---------- 21

4. MATERIAL E MÉTODOS ---------- 23

4.1. OPERAÇÃO DOS REATORES---------- 24

4.1.1. INÓCULO DOS REATORES---------- 25

4.1.2. CONDIÇÕES OPERACIONAIS---------- 25

4.2. LODO ENRIQUECIDO NOS REATORES ---------- 27

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA BIOMASSA ---------- 28

4.3. ESTUDO DA DIVERSIDADE BACTERIANA DOS REATORES ---------- 28

4.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA ---------- 29

4.3.2.REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)---------- 29

4.3.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE ---------- 30

4.3.4. ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE ---------- 31

4.3.5. CÁLCULO DO COEFICIENTE DE SIMILARIDADE ---------- 31

4.4. QUANTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE DESNITRIFICANTE AUTOTRÓFICA DOS REATORES ---------- 31

4.5. ENRIQUECIMENTO DA CULTURA DESNITRIFICANTE AUTOTRÓFICA ---------- 33

4.5.1. SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES ---------- 34

4.5.2. SOLUÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO ---------- 35

4.5.3. SOLUÇÃO DE SULFETO DE SÓDIO HIDRATADO ---------- 35

4.5.4. SOLUÇÕES DE NITRATO E NITRITO ---------- 36

4.5.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS ---------- 36

4.5.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA CULTURA ENRIQUECIDA ---------- 37

4.6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA CULTURA ENRIQUECIDA ---------- 37

4.6.1. EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA ---------- 37

4.6.2. DGGE E RECUPERAÇÃO DO DNA DAS BANDAS RECORTADAS ---------- 37

4.6.3. SEQUENCIAMENTO DA CULTURA PURIFICADA ---------- 38

4.6.4. ANÁLISE DAS SEQUENCIAS DE rRNA 16S ---------- 39

4.7. ESTUDOS FISIOLÓGICOS DA CULTURA PURIFICADA ---------- 39

4.7.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE SULFETO DE SÓDIO PARA A MANUTENÇÃO DO pH DA CULTURA. ---------- 39

4.7.2. LIMITES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO PELOS SUBSTRATOS. ---------- 39

4.7.3. CURVA-PADRÃO DE CRESCIMENTO CELULAR DA CULTURA PURIFICADA. ---------- 40

4.7.4. VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DA CULTURA PURIFICADA ---------- 41

4.7.5. VARIAÇÃO TEMPORAL DOS SUBSTRATOS ---------- 41

4.7.6. VELOCIDADE ESPECÍFICA DE UTILIZAÇÃO DO NITRATO. ---------- 42

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO ---------- 43

5.1. DIVERSIDADE BACTERIANA DOS REATORES ---------- 43

5.2. COMUNIDADE DESNITRIFICANTE AUTOTRÓFICA ---------- 45

5.3. OBTENÇÃO DA CULTURA AUTOTRÓFICA DESNITRIFICANTE PURIFICADA ---------- 47

5.3.1. MICROSCOPIA E COLORAÇÃO DE GRAM ---------- 48

5.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA CULTURA PURFICADA ---------- 50

5.5. ESTUDOS FISIOLÓGICOS DA CULTURA PURIFICADA ---------- 54

5.5.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE SULFETO DE SÓDIO PARA A MANUTENÇÃO DO PH DA CULTURA. ---------- 54

5.5.2. LIMITES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO PELOS SUBSTRATOS. ---------- 55

5.5.3.AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E CONSUMO DOS SUBSTRATOS ---------- 56

6. CONCLUSÕES ---------- 61

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- 62

1. INTRODUÇÃO

O contínuo crescimento industrial e populacional tem causado aumento na produção de efluentes contendo compostos que ameaçam a saúde pública e a qualidade dos recursos hídricos. Apesar da intensificação da legislação a fim de coagir indústrias e prefeituras a se comprometerem com a problemática ambiental, o tratamento de efluentes é visto como um custo sem benefícios econômicos, desestimulando o cumprimento das normas. Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que busquem métodos menos custosos e mais sustentáveis de tratamento.

Esse trabalho busca contribuir para o desenvolvimento de tecnologia sustentável na remoção de nitrogênio aplicada ao tratamento de efluentes da digestão anaeróbia. A utilização de reator anaeróbio para a remoção de matéria orgânica apresenta vantagens econômicas e operacionais em relação ao tratamento aeróbio, e vem sendo crescentemente utilizado como primeira unidade de tratamento nas Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) brasileiras. No entanto, a digestão anaeróbia não é eficaz na remoção de nitrogênio e fósforo, e seu efluente depende de um pós-tratamento para que se enquadre nos padrões ambientais estabelecidos pela legislação brasileira.

A remoção de compostos nitrogenados é especialmente importante para a manutenção da qualidade dos corpos d'água que irão receber o efluente. A desnitrificação é comumente realizada por um processo biológico, envolvendo uma etapa de nitrificação autotrófica, que requer a disponibilidade de alcalinidade e oxigênio no meio, seguida de uma etapa de desnitrificação heterotrófica, que depende de uma fonte orgânica de elétrons e carbono. Como o efluente de reatores anaeróbios possui uma baixa concentração de matéria orgânica prontamente biodegradável, a etapa de desnitrificação heterotrófica depende da adição de uma fonte exógena de carbono, gerando custos ao processo.

O Laboratório de Processos Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos (USP) vem investigando o processo de desnitrificação autotrófica utilizando como fonte de elétrons o sulfeto presente no próprio biogás e efluente do tratamento anaeróbio, obtendo resultados que demonstram a viabilidade do processo.

A desnitrificação autotrófica utilizando o sulfeto presente no próprio processo como fonte de elétrons é uma alternativa vantajosa e sustentável. A remoção convencional de sulfetos é realizada através de processos físico-químicos, envolvendo aeração, oxidação e precipitação química, utilizando agentes oxidantes que trazem custos elevados, além dos problemas ambientais relacionados à adição de compostos químicos ao meio ambiente.

O estudo dos microrganismos capazes de realizar a desnitrificação autotrófica pode auxiliar o processo de enriquecimento dos reatores com comunidades microbianas de interesse, aplicando os dados da fisiologia desses microrganismos na operação dos reatores. Este trabalho mostra os resultados do enriquecimento, isolamento, caracterização nutricional e cinética de crescimento dos microrganismos envolvidos na desnitrificação autotrófica em um reator enriquecido a partir de efluente de tratamento anaeróbio.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi avaliar a comunidade bacteriana envolvida na desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons em um reator vertical de leito fixo, alimentado com água residuária sintética simulando efluente anaeróbio nitrificado.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o enriquecimento da comunidade bacteriana nos reatores, comparando as condições de redução autotrófica de nitrato e redução autotrófica de nitrito quanto à composição da comunidade enriquecida;
- Quantificar o enriquecimento de uma comunidade desnitrificante autotrófica a partir de lodo efluente de reator anaeróbio nas diferentes condições de operação dos reatores;
- Obter cultura desnitrificante autotrófica purificada a partir do reator enriquecido;
- Identificar a comunidade bacteriana presente na cultura desnitrificante autotrófica purificada;
- Avaliar as condições de crescimento da cultura purificada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica apresenta primeiramente os aspectos físico-químicos referentes à remoção biológica de nitrogênio, seguido de uma revisão detalhada sobre o processo de desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons, da apresentação dos principais microrganismos que podem estar envolvidos no processo e das técnicas utilizadas na caracterização molecular da comunidade.

3.1. PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES ANAERÓBIOS

O tratamento anaeróbio de águas residuárias tem sido freqüentemente utilizado em países de clima quente como o Brasil. Apesar das inúmeras vantagens quanto ao baixo custo, simplicidade de operação e baixa produção de sólidos, o sistema apresenta limitações quanto ao efluente gerado, que dificilmente atende aos padrões estabelecidos pela legislação ambiental devido às elevadas concentrações de nutrientes e organismos patogênicos (Chernicharo, 2006).

Efluentes com excesso de nutrientes favorecem a produtividade primária no corpo de água receptor, levando ao consumo imediato do oxigênio disponível, eutrofizando o ecossistema e ameaçando a vida aquática. Sendo assim, a remoção dos compostos nitrogenados no pós-tratamento dos efluentes de reatores anaeróbios é especialmente importante para a qualidade do corpo d'água que irá receber o efluente.

3.2. REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Os compostos nitrogenados podem ser removidos das águas residuárias através de uma variedade de processos físico-químicos e biológicos. No entanto, a remoção biológica é mais eficiente e apresenta menor custo que os processos físico-químicos. No tratamento biológico convencional, o processo ocorre em duas etapas, a nitrificação autotrófica seguida da desnitrificação heterotrófica.

A nitrificação ocorre pela oxidação quimiolitoautotrófica do N-amoniacal a nitrito e seqüencialmente a nitrato, sob condições estritamente aeróbias. A reação 3.1 descreve o processo de nitritação e a reação 3.2 o processo de nitratação (Schmidt *et al.*, 2003).

$$NH_4^+ + 3/2\ O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2\ H^+ \qquad (3.1)$$

$$NO_2^- + 1/2\ O_2 \rightarrow NO_3^- \qquad (3.2)$$

A nitrificação biológica é realizada por diversos gêneros de bactérias, que utilizam amônia ou nitrito como fonte de energia, dióxido de carbono como fonte inorgânica de carbono e oxigênio molecular como receptor final de elétrons. Os gêneros descritos capazes de oxidar a amônia são as *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosopira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus*, membros da classe β-Proteobactéria, e no processo de nitratação os gêneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* e *Nitrocystis* (Teske *et al.*, 1994).

A desnitrificação biológica é usualmente um processo heterotrófico, realizado sob condições anóxicas, onde o composto nitrogenado (NO_3^- ou NO_2^-) é reduzido a gás nitrogênio utilizando compostos orgânicos como fonte de energia e carbono. O processo envolve as etapas de redução do nitrato a nitrito, a óxido nítrico, a óxido nitroso e a nitrogênio gasoso, como apresenta o esquema a seguir (Metcalf and Eddy, 2003):

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$$

As reações 3.3 e 3.4 descrevem as reações gerais para a desnitrificação heterotrófica a partir de nitrato e de nitrito, respectivamente (Schmidt *et al.*, 2003).

$$2\ NO_3^- + 10\ H^+ + 10\ e^- \rightarrow N_2 + 2\ OH^- + 4\ H_2O \qquad \Delta G°(W) = -1120{,}5\ kJ/reação \quad (3.3)$$

$$2\ NO_2^- + 6\ H^+ + 6\ e^- \rightarrow N_2 + 2\ OH^- + 2\ H_2O \qquad \Delta G°(W) = -794{,}1\ kJ/reação \quad (3.4)$$

A desnitrificação é comumente realizada por microrganismos Gram-negativos das classes alfa e beta de *Proteobacteria*, como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Também são conhecidos desnitrificantes *Bacillus* Gram-positivos e algumas *Archaeas* halofílicas, como *Halobacterium* (Zumft, 1992).

Como o processo de remoção biológica convencional apresenta desvantagens econômicas devido ao alto consumo de oxigênio na nitrificação e à necessidade de adição de doadores de elétrons orgânicos na desnitrificação heterotrófica, é justificável a busca por novas tecnologias de remoção de nitrogênio, que permitam melhores eficiências de tratamento juntamente com redução dos custos operacionais.

3.3. REMOÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS REDUZIDOS DE ENXOFRE

A produção de sulfetos é um dos maiores problemas associados ao tratamento anaeróbio de efluentes contendo sulfato (SO_4^{2-}). A produção de sulfetos pelas bactérias sulfato redutoras torna a operação dos reatores muito mais difícil, uma vez que outros microrganismos habitantes do reator podem ter o crescimento inibido pelo aumento na concentração de sulfetos.

O sulfeto gerado no tratamento anaeróbio se encontra nas formas de S_2^-, HS^- e H_2S em solução, na forma de H_2S no biogás, e na forma de sulfetos metálicos insolúveis. As formas de sulfeto solúveis se encontram em equilíbrio conforme apresentado na equação 3.5 (Speece, 1983).

$$H_2S_{(aq.)} \leftrightarrow HS^-_{(aq.)} + H^+ \leftrightarrow S_2^-{}_{(aq.)} \qquad (3.5)$$

A distribuição das formas de sulfeto no equilíbrio depende do pH da solução, como apresentado na figura 1. Em pH neutro, o equilíbrio químico varia entre as formas H_2S e HS^-, podendo ser observado que pequenas variações no pH afetam significativamente a concentração de H_2S (Speece, 1983). O equilíbrio entre H_2S na fase líquida e na fase gasosa se dá de acordo com a Lei de Henry, apresentada na equação 3.6. O coeficiente de absorção

(α) do H_2S esta em torno de 2,0 a 30°C, sendo possível afirmar que a maior parcela da concentração do H_2S está em solução (Wilhelm *et al.*, 1977).

$$H_2S_{(aq)} = \propto . H_2S_{(gas)} \tag{3.6}$$

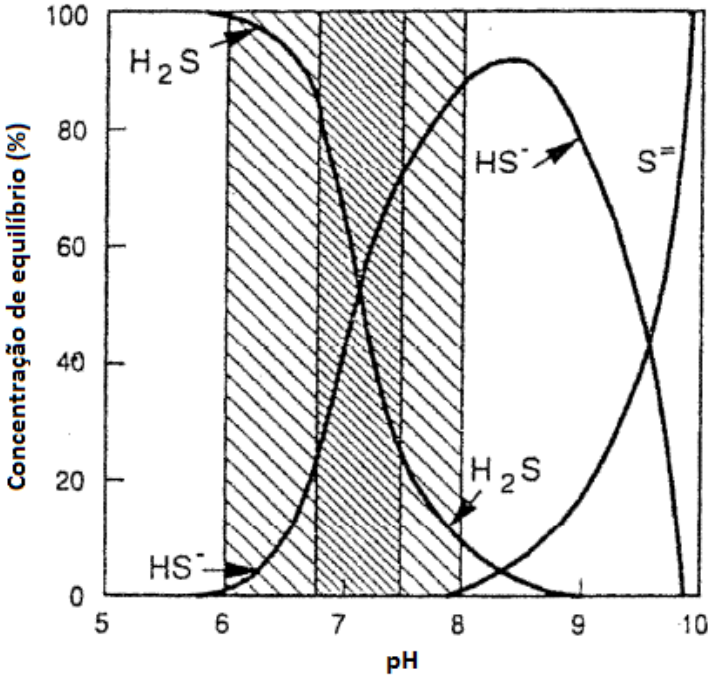


Figura 1. Distribuição das formas de sulfeto para diferentes valores de pH (Speece, 1983).

Os compostos reduzidos de enxofre podem ser removidos do efluente anaeróbio através de processos físico-químicos. Isso pode ser feito através da adição de oxidantes à água residuária, resultando na formação de sulfatos (SO_4^{2-}) (Henshaw *et al.*, 1998) ou através da incineração do gás H_2S, oxidando o sulfeto de hidrogênio a dióxido de enxofre (SO_2). Ambos os processos geram subprodutos indesejáveis, além do alto custo operacional.

Uma alternativa é o tratamento biológico do efluente anaeróbio, utilizando microrganismos capazes de oxidar os compostos reduzidos do enxofre, convertendo as formas de sulfeto a

enxofre elementar ou sulfato. A formação de sulfato libera mais energia e é preferida pelos microrganismos quando não há limitação do composto oxidado (oxigênio ou nitrogênio).

No caso de limitação de composto oxidado ou excesso de sulfeto, a oxidação do sulfeto forma enxofre elementar (Janssen *et al.*, 1999). O enxofre elementar pode ser removido fisicamente do efluente e pode ser reutilizado como matéria prima nas indústrias de fertilizante, na produção de ácido sulfúrico e na biolixiviação de metais (Manconi *et al.*, 2007).

A oxidação biológica do sulfeto é realizada por uma variedade de gêneros de bactérias, incluindo as sulfobactérias aeróbias dos gêneros *Thiobacillus*, *Beggiatoa* e *Thiothrix* e as sulfobactérias anaeróbias fototróficas como as púrpuras dos gêneros *Chromatium* e *Thiocapsa* e as verdes do gênero *Chlorobium* (Mahmood et al., 2009).

3.4. DESNITRIFICAÇÃO AUTOTRÓFICA UTILIZANDO SULFETO COMO DOADOR DE ELÉTRONS

A desnitrificação autotrófica utiliza a energia liberada por reações inorgânicas de oxi-redução, utilizando hidrogênio ou compostos reduzidos de enxofre (HS^-, H_2S, S, $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$ ou SO_3^{2-}) como doadores de elétrons para a redução do composto nitrogenado, utilizando compostos inorgânicos como fonte de carbono (CO_2, HCO_3) (Ahn, 2006). O processo permite reduzir os custos operacionais, por não necessitar de fontes externas de carbono orgânico e produzir menores quantidades de lodo.

A utilização do sulfeto como doador de elétrons na desnitrificação de efluentes anaeróbios é muito interessante, visto que a digestão anaeróbia produz sulfeto de hidrogênio (Foresti *et al.*, 2006). A equação 3.7 descreve a redução de nitrato utilizando sulfeto como fonte de energia, produzindo sulfato e N_2. Dependendo das condições de operação do sistema, a oxidação de sulfeto pode ocorrer parcialmente a enxofre elementar, como representado na equação 3.8,

$$S^{-2} + 1{,}6\ NO_3^- + 1{,}6\ H^+ \rightarrow SO_4^{-2} + 0{,}8\ N_2 + 0{,}8\ H_2O \qquad \Delta G°(W) = -743{,}9\ kJ/reação \quad (3.7)$$

$$S^{-2} + 0{,}4\ NO_3^- + 2{,}4\ H^+ \rightarrow S^0 + 0{,}2\ N_2 + 1{,}2\ H_2O \qquad \Delta G°(W) = -191\ kJ/reação \quad (3.8)$$

Também é possível ocorrer a desnitrificação com a oxidação de enxofre elementar a sulfato, como representa a equação 3.9 (Beristain-Cardoso *et al.*, 2006), havendo consumo de alcalinidade, ao contrário dos casos em que sulfeto é oxidado a enxofre elementar.

$$S^0 + 1{,}2\ NO_3^- + 0{,}4\ H_2O \rightarrow SO_4^{-2} + 0{,}6\ N_2 + 0{,}8\ H^+ \qquad \Delta G°(W) = -547{,}6\ kJ/reação \quad (3.9)$$

O uso de compostos reduzidos de enxofre como doadores de elétrons para a desnitrificação autotrófica já foi observado em diferentes tipos de águas residuárias industriais e subterrâneas contaminadas com compostos de nitrogênio e enxofre. O nitrato gerado na nitrificação pode ser recirculado para a fase anaeróbia do tratamento, promovendo simultaneamente a oxidação de sulfetos e a desnitrificação (Vaiopoulou *et al.*, 2005).

A cinética de consumo do nitrato já foi descrita como uma reação de ordem zero, onde a velocidade de desnitrificação não é afetada pela concentração dos substratos (Garbossa, 2006 e Moraes, 2009). No entanto, a relação entre as concentrações molares dos compostos de nitrogênio e enxofre (N/S) afetam os produtos gerados no processo. Na condição estequiométrica, essa relação é de 1,6 N/S.

Beristain-Cardoso et al. (2006) investigaram a fisiologia e cinética da desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto de hidrogênio, enxofre elementar e tiossulfato como doadores de elétrons. Eles observaram a completa oxidação de sulfeto a sulfato quando as concentrações de nitrato foram iguais ou superiores aos valores requeridos estequiometricamente, enquanto que em concentração de nitrato limitante foi observada a oxidação parcial do sulfeto a enxofre elementar.

Manconi et al. (2007) chegou a resultados semelhantes ao investigar a desnitrificação autotrófica por *Thiobacillus denitrificans* em sistemas de lodos ativados recebendo efluentes com baixa relação C/N. Quando o reator foi operado com relação N/S com excesso de enxofre, a eficiência atingida foi superior a 90 % na remoção de nitrogênio. Quando a concentração de sulfeto foi limitante (N/S = 1,8), a eficiência de remoção de nitrogênio decresceu para 60 %. Em todas as condições testadas, foi observada a formação de sulfato

como principal produto e enxofre elementar como produto intermediário, tornando o líquido no interior do reator turvo e esbranquiçado.

No laboratório de Processo Biológicos da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo foi constatada a viabilidade técnica da aplicação da desnitrificação autotrófica no tratamento de efluentes de reatores anaeróbios nitrificados e parcialmente nitrificados, em reatores operados em batelada contendo biomassa imobilizada em espumas de poliuretano, utilizando sulfeto como doador de elétrons. (Moraes, 2009)

Moraes (2009) avaliou as condições de redução de nitrato e nitrito, com relações N/S estequiométricas e de excesso de sulfeto. A condição de excesso de sulfeto favoreceu a desnitrificação, sendo observada redução completa utilizando nitrato ou nitrito, enquanto que na condição estequiométrica a desnitrificação não foi completa, acumulando nitrito. Os produtos finais da oxidação do sulfeto foram afetados pela relação N/S, havendo evidências da formação de enxofre elementar na condição de N/S com excesso de sulfeto.

3.5. DESNITRIFICAÇÃO BIOLÓGICA A PARTIR DA REDUÇÃO DE NITRITO

A desnitrificação pela redução de nitrito também é conhecida como desnitrificação pela via curta. Nesse processo, a etapa de nitratação é eliminada e o nitrito formado pela oxidação do N-amoniacal forma gás dinitrogênio (N_2) antes de ser oxidado a nitrato, o que reduz os custos operacionais pela menor necessidade de oxigenação e fonte de carbono exógena para a desnitrificação.

Para que a via curta ocorra, é necessária a inibição das bactérias oxidadoras de nitrito, o que pode ser conseguido pela manipulação de parâmetros operacionais como as concentrações de amônia e hidroxilamina livre, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, entre outros. Como a concentração de amônia livre está relacionada à concentração de N-amoniacal total, águas residuárias ricas em compostos nitrogenados, como é o caso dos efluentes de reatores anaeróbios, são ideais para a aplicação da remoção biológica de nitrogênio pela via curta (Bae *et al.*, 2001).

O processo vem sendo investigado por diversos grupos de pesquisa, apresentando taxas de redução de nitrito maiores ou menores que as taxas de redução de nitrato, dependendo das condições experimentais. Do ponto de vista bioquímico, o nitrito apresenta vantagens como receptor de elétrons na desnitrificação, já que a enzima responsável pelo processo, a *nitrito reductase*, está localizada na parte externa da membrana celular, enquanto a enzima responsável pela redução do nitrato, a nitrato reductase, está localizada na parte interna da membrana. Por outro lado, a redução de nitrito está mais sujeita a mudanças ambientais, sendo mais sensível a mudanças no pH (Chung and Bae, 2002).

3.6. MICRORGANISMOS DESNITRIFICANTES OXIDADORES DE SULFETO

O processo de desnitrificação autotrófica pela oxidação de compostos de enxofre é realizado por bactérias quimiolitoautotróficas, capazes de oxidar compostos inorgânicos reduzidos de enxofre, como sulfetos (S^{2-}), enxofre elementar (S_0), tiossulfato ($S_2O_3^{2-}$) ou sulfito (SO_3^{2-}), a partir da redução de nitrato ou nitrito (Kuenen *et al.*, 1992). O processo apresenta importante papel na ciclagem de minerais, interligando os ciclos do nitrogênio e do enxofre (Korom, 1992).

Entre as espécies conhecidas capazes de realizar a oxidação autotrófica de compostos de enxofre acoplada à redução de compostos nitrogenados estão as espécies autotróficas obrigatórias, *Thiobacillus denitrificans* e *Thiomicrospira denitrificans* (Kuenen et al., 1992) e a espécie autotrófica facultativa *Pseudomonas stutzeri* (Mahmood *et al.*, 2009).

Krishna e Philip, em 2005, avaliaram a desnitrificação autotrófica por *Thiobacillus denitrificans* na presença de sulfeto. Eles observaram a oxidação completa do sulfeto pelo processo de desnitrificação autotrófica. As análises demonstraram que 40 a 60 % da concentração inicial de sulfeto foi convertida a sulfato e o restante a enxofre elementar. O microrganismo apresentou velocidade máxima específica de crescimento de 0,63 h^{-1}, com tempo de duplicação de 1,1 horas. A velocidade de redução do nitrato ficou em torno de 0,05 g de N. $gSSV^{-1}$. h^{-1} e os valores de pH aumentaram de 7,5 para 8,0 durante a oxidação incompleta do sulfeto em função da formação de enxofre elementar.

Mahmood et al. (2009) descreveram a oxidação de sulfeto em um reator anóxico operado em condição de redução de nitrito. O reator foi operado em baixa relação N/S, com excesso de sulfeto e a desnitrificação completa foi observada. O microrganismo responsável foi identificado como *Pseudomonas stutzeri*, uma bactéria autotrófica facultativa, que, nas condições avaliadas, apresentou velocidade máxima de crescimento de 0,035 h^{-1}, com tempo de duplicação de 21,5 horas. A velocidade de redução do nitrito foi de 0,024 g de N. $gSSV^{-1}$. h^{-1}.

A escassez de estudos sobre os microrganismos capazes de colonizar os reatores desnitrificantes autotróficos justifica a importância deste trabalho. Conhecer a população microbiana presente em um reator permite conhecer as vantagens e desvantagens metabólicas do sistema, já que é a atividade biológica da biomassa que determina as taxas de reação do processo (Reyes-Avila *et al.*, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP). As etapas experimentais da pesquisa estão apresentadas na Figura 4.1.

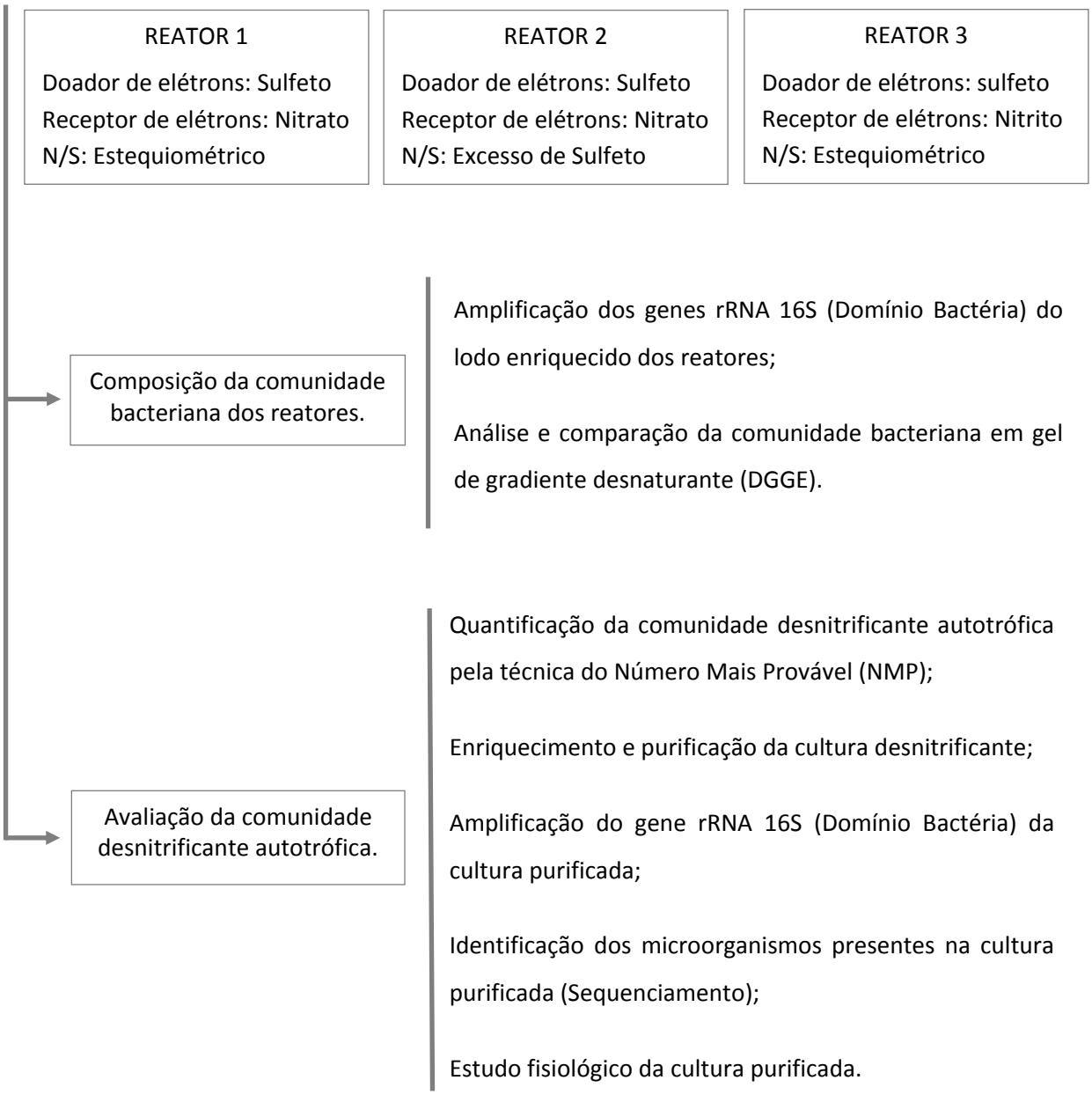


Figura 2. Fluxograma das etapas experimentais.

O estudo utilizou amostras obtidas de três reatores operados em condição de desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons. Os ensaios foram realizados pela doutoranda Bruna de Souza Moraes como parte do seu projeto de pesquisa, onde foram estudadas as condições de desnitrificação autotrófica utilizando nitrato e nitrito como receptores de elétrons e a condição de sulfeto em excesso.

O lodo foi coletado diretamente das matrizes suporte, após um mês de operação dos reatores. Parte da biomassa foi armazenada para o estudo e comparação da diversidade bacteriana nos reatores e outra parte foi utilizada na avaliação das comunidades desnitrificantes autotróficas.

A comunidade bacteriana dos reatores foi avaliada através de ferramentas da biologia molecular. Os fragmentos rRNA 16S foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para o Domínio *Bacteria*. A diversidade bacteriana, nas diferentes condições de operação, foi avaliada através de eletroforese em gel gradiente desnaturante (DGGE) e comparada utilizando o coeficiente de similaridade de bandas.

A quantificação da comunidade desnitrificante autotrófica nos reatores foi feita pela técnica do número mais provável (NMP). O enriquecimento da cultura de interesse foi realizado a partir da biomassa do reator desnitrificante autotrófico com relação estequiométrica de nitrato e sulfeto dissolvidos, utilizando-se, como ponto de partida, a maior diluição positivada no ensaio de NMP.

A caracterização da cultura purificada foi feita utilizando técnicas da microbiologia clássica e biologia molecular, obtendo-se dados de morfologia, padrão de crescimento, utilização dos substratos, velocidade específica de crescimento e identificação da cultura através do seqüenciamento de um fragmento do gene rRNA 16S.

4.1. OPERAÇÃO DOS REATORES

O estudo utilizou o lodo enriquecido de três reatores verticais de leito fixo, operados pela doutoranda Bruna de Souza Moraes. As metodologias apresentadas nesta secção fazem

parte do seu projeto de pesquisa e serão descritas de forma simplificada, abordando apenas as informações essenciais ao entendimento da operação dos reatores.

4.1.1. INÓCULO DOS REATORES

Os reatores foram inoculados em matrizes cúbicas de espuma de poliuretano com lodo biológico proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) da estação de tratamento de água residuária do abatedouro de aves da avícola Dakar S.A., localizada em Tietê-SP. O lodo foi caracterizado por (Hirasawa, 2008) como predominantemente metanogênico, e foi escolhido como inóculo devido à sua reconhecida diversidade microbiana.

4.1.2. CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Os reatores foram alimentados com água residuária sintética simulando efluente nitrificado típico de águas residuárias municipais, similar ao apresentado por (Callado and Foresti, 2000) com modificações para favorecer o crescimento autotrófico. A concentração de nitrogênio utilizada teve como base a concentração usualmente encontrada nesse tipo de efluente, mantendo a concentração de 20 $mg.L^{-1}$ de nitrogênio. A concentração de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) foi aumentada para 2 g/L^{-1} para manutenção do pH, que se torna básico devido à adição da solução de sulfeto. A solução de micronutrientes foi a descrita por (Beristain-Cardoso *et al.*, 2006), na concentração de $2mL.L^{-1}$. A composição da água residuária sintética nitrificada e da solução de micronutrientes estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Composição da água residuária sintética nitrificada.

Componentes	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Nitrato de Potássio (KNO_3)/ Nitrito de Sódio ($NaNO_2$)	144/99
Cloreto de Amônio (NH_4Cl)	16
Fosfato de Potássio (K_2HPO_4)	36
Cloreto de Magnésio hidratado ($MgCl_2.6H_2O$)	28
Cloreto de Cálcio hidratado ($CaCl_2.2H_2O$)	18
Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$)	2000

Fonte: Callado & Foresti (2000) adaptado.

Tabela 2. Composição da solução de micronutrientes.

Componentes	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA)	1,7
Sulfato de Zinco hidratado ($ZnSO_4.7H_2O$)	0,14
Cloreto de Cálcio hidratado ($CaCl_2$. 2H2O)	0,24
Cloreto de Manganês ($MnCl_2$)	0,1
Molibdato de Amônio ($(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$)	0,04
Sulfato de Cobre hidratado ($CuSO_4.H_2O$)	0,07
Cloreto de Cobalto hidratado ($CoCl_2$. $6H_2O$)	0,07

Fonte: Beristain-Cardoso et al. (2006)

Para os ensaios em que o nitrito foi o receptor de elétrons, a solução de KNO_3 foi substituída por $NaNO_2$, mantendo a concentração de nitrogênio (20 $mgN.L^{-1}$). Ambas as soluções foram

adicionadas separadamente ao meio através de seringas, para que fosse mantida a mesma precisão da solução de sulfeto, que também foi fornecida por meio de seringas para minimizar as perdas da parcela solúvel no meio.

O sulfeto foi fornecido na forma de sulfeto de sódio hidratado ($Na_2S.9H_2O$). Como as espécies de sulfeto são formadas de acordo com o equilíbrio químico da solução, a concentração de sulfeto foi expressa em termos de sulfeto dissolvido total (SDT), conforme a equação 4.1.

$$SDT\ (mgS.L^{-1}) = H_2S_{(aq)} + HS^-_{(aq)} + S^{2-}_{(aq)} \quad (4.1)$$

Na tabela 3, estão apresentadas as concentrações teóricas de sulfeto dissolvido total (SDT) e de nitrogênio ($N\text{-}NO_x^-$) para as respectivas relações de nitrogênio e enxofre dissolvido (N/S). A condição 1 se refere à redução de nitrato em condição N/S estequiométrica, a condição 2 se refere à redução de nitrato em condição de excesso de sulfeto e a condição 3 se refere à redução de nitrito em condição N/S estequiométrica.

Tabela 3. Concentrações teóricas dos doadores e receptores de elétrons nas diferentes condições avaliadas.

Condição	Receptor de elétrons	N/S	SDT	$N\text{-}NO_x^-$
1	$N\text{-}NO_3^-$ (KNO_3)	1,6	30 $mgS.L^{-1}$	20 $mgN.L^{-1}$
2	$N\text{-}NO_3^-$ (KNO_3)	0,8	60 $mgS.L^{-1}$	20 $mgN.L^{-1}$
3	$N\text{-}NO_2^-$ ($NaNO_2$)	2,7	17 $mgS.L^{-1}$	20 $mgN.L^{-1}$

4.2. LODO ENRIQUECIDO NOS REATORES

A biomassa dos reatores foi coletada após 30 dias de operação. Uma porção de espumas de poliuretano foi retirada e transferida para um bequer contendo 10 mL da água residuária sintética utilizada na alimentação dos reatores.

Para o estudo da diversidade bacteriana dos reatores, os sólidos foram desprendidos da espuma com o auxílio de um bastão de vidro e o líquido turvo foi centrifugado a 6.000 rpm por 10 minutos. O pellet obtido foi lavado com 5 mL de tampão PBS (137 mM de NaCl; 2,6 mM de KCl; 1,7 mM de KH_2PO_4; pH 7,4), novamente centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* imediatamente armazenado a -20°C.

Para o estudo da comunidade desnitrificante autotrófica dos reatores, os sólidos foram desprendidos da espuma com o auxílio de um bastão de vidro e o líquido turvo foi utilizado como inóculo nos ensaios de quantificação, enriquecimento e purificação da cultura desnitrificante autotrófica.

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA BIOMASSA

O lodo dos reatores foi caracterizado quanto a morfologia e diversidade microbiana através de microscopia óptica comum utilizando microscópio Olympus BX-60, acoplado à câmera para captura de imagens (Evolution QE, Media Cybernetics Inc., USA) utilizando software Image Pro-Plus 4.

4.3. ESTUDO DA DIVERSIDADE BACTERIANA DOS REATORES

A caracterização qualitativa da comunidade bacteriana dos reatores foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR- Polymerase Chain Reaction), seguida de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) das amostras do inóculo dos reatores e do lodo coletado no final da operação dos reatores.

A técnica de PCR/DGGE permite comparar a composição de duas comunidades e monitorar as mudanças nas populações ao longo de sucessões ecológicas, mudanças ambientais ou processos biotecnológicos através das seguintes etapas: a) extração do DNA ribossomal, b) amplificação do fragmento rRNA 16S por reação em cadeia da polimerase (PCR), c) separação do fragmento-alvo pela desnaturação parcial da dupla hélice através de gel de

gradiente desnaturante. As metodologias estão descritas detalhadamente em Sakamoto *et al.*, (2005).

A técnica de PCR/DGGE apresenta vantagens por se tratar de uma técnica bastante confiável, reprodutível, rápida e de baixo custo, que permite a análise de várias amostras ao mesmo tempo. No entanto, a técnica apresenta limitações que estão ligadas principalmente à eficiência na extração do DNA, à problemas intrínsecos da técnica de PCR e ao baixo poder de detecção do método. Além disso, fragmentos com variações na composição de bases do gene rRNA 16S podem apresentar características de mobilidade semelhantes e uma única espécie pode apresentar várias cópias do gene rRNA 16S, gerando diversas bandas.

4.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico total foi extraido utilizando método direto com pérolas de vidro e mistura fenol: clorofórmio: tampão (1: 1: 1 v/v) segundo protocolo descrito por (Griffiths *et al.*, 2000).

4.3.2.REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os fragmentos rRNA 16S das amostras foram amplificados utilizando *primer* específico para o Domínio *Bacteria* (968 F e 1392 R) com GC *clamp* (Nielsen et al., 1999), como descrito na tabela 4.

A reação em cadeia da polimerase (PCR – polymerase chain reaction) utilizou: 0,5 µL de Taq-DNA polymerase (5U/ µL); 5 µL de tampão PCR 10X; 1,5 µL de $MgCl_2$ (50 mM); 5 µL de dNTP (2mM); 1 µL de *primer* “forward” (100 pmol); 1 µL de *primer* “reverse” (100 pmol) e 2 µL de DNA extraído. A programação do termociclador utilizada na reação de amplificação está apresentada na tabela 5.

Tabela 4. Primers utilizados na reação de polimerase em cadeia (PCR).

Microrganismo	Primer e sequência (5'- 3')	Referência
Domínio *Bacteria*	968FGC (5'- AAC CGC GAA GAA CCT TAC – 3') 1392R (5'- AACG GGC GGT GTG TAC – 3') GC clamp (5'- CGC GGC CCG GGG CGC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG – 3')	Nielsen et al. (1999)

Tabela 5. Programação do termociclador utilizado nas reações de amplificação.

Desnaturação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão	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				

4.3.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da extração de DNA e da amplificação por PCR foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose. Para a verificação do produto da extração de DNA foram utilizados agarose 1% e marcador *High* de elevada massa molecular e para a verificação do produto da amplificação por PCR foram utilizados agarose 1% e marcador *Low* de baixa massa molecular.

4.3.4. ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE

Os fragmentos dos genes rRNA 16S, amplificados com primers para o Dominio Bacteria, contendo GC *clamp*, foram separados por DGGE segundo o protocolo de (Muyzer *et al.*, 1993), utilizando gradiente de 40 a 60% do gel de gradiente desnaturante. A eletroforese foi feita a 75 volts por 16 horas, a 65°C e o gel foi analisado pela leitura dos padrões de bandas em aparelho Eagle Eye TM III (Stratagene) sob exposição a 254nm UV, acoplado ao computador e software Eagle Sight.

4.3.5. CÁLCULO DO COEFICIENTE DE SIMILARIDADE

Os padrões de bandas do DGGE foram comparados pelo coeficiente de similaridade de Gillan (Gillan *et al.*, 1998), utilizando a equação 4.2. A equação permite calcular o coeficiente de similaridade (Cs) entre duas amostras, considerando o número de bandas do DGGE de cada amostra e o número de bandas comuns às amostras.

$$Cs = 2J/ (a+b) \times 100 \qquad (4.2)$$

Sendo:

a - número de bandas do DGGE na amostra 1
b - número de bandas do DGGE na amostra 2
J - número de bandas comuns dos DGGE

4.4. QUANTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE DESNITRIFICANTE AUTOTRÓFICA DOS REATORES

A densidade das populações desnitrificantes autotróficas viáveis foi estimada através da técnica do Número Mais Provável (NMP), seguindo metodologia descrita no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA/AWWA, 2005). Foram quantificados o inóculo e o lodo dos três reatores, a fim de comprovar o enriquecimento do

lodo nos reatores e também observar os efeitos das diferentes condições de operação dos reatores no enriquecimento da comunidade desnitrificante autotrófica.

Os ensaios foram realizados em frascos de antibiótio (30 mL), a temperatura de 30°C, sem agitação, com 20 diluições seriais em quintuplicata. O meio de cultura utilizado foi a água residuária sintética nitrificada autotrófica utilizada na alimentação dos reatores. A determinação da presença dos microrganismos desnitrificantes autotróficos foi feita pela determinação do consumo do composto nitrogenado.

O meio foi preparado conforme a descrição da tabela 4.1, sem adição do composto nitrogenado e do bicarbonato de sódio. Os frascos de antibiótico contendo a água residuária sintética foram selados com tampas de alumínio, tiveram a atmosfera preenchida com mistura padrão dos gases N_2:CO_2 (70:30%) para expulsão do oxigênio e manutenção do pH e foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm durante 20 minutos.

As soluções de bicarbonato de sódio, micronutrientes, sulfeto de sódio (Na_2S. $9H_2O$) e composto nitrogenado (KNO_3 ou $NaNO_2$) foram adicionadas a partir de soluções estoque estéreis, com alíquotas calculadas para um volume final de 9 mL. A quantificação do inóculo foi feita em meio de cultura contendo nitrato em condição N/S estequiométrica e a quantificação do lodo dos reatores foi realizada mantendo as concentrações e relações N/S apresentadas anteriormente na tabela 4.3.

A leitura dos ensaios foi realizada após 7 dias. A determinação do nitrato foi efetuada pela adição de solução de difenilamina ácida (200 mg de difenilamina ($(C_6H_5)2NH$) em 100 mL de H_2SO_4 concentrado) à cultura, que na presença de nitrato oxida e se transforma em um sal de coloração azul. A determinação de nitrito foi efetuada por meio de injeção de fluxo (FIA). O cálculo do NMP foi feito utilizando a tabela padrão de probabilidade com intervalo de confiança de 95% utilizando a equação 4.3.

$$\text{NMP/100 mL} = \frac{\text{Valor NMP da tabela} \times 10}{\text{Menor diluição da combinação de tubos positivos}} \qquad (4.3)$$

4.5. ENRIQUECIMENTO DA CULTURA DESNITRIFICANTE AUTOTRÓFICA

O enriquecimento da cultura desnitrificante autotrófica presente no reator teve como ponto de partida a maior diluição positivada no ensaio de NMP na condição de redução de nitrato em condição estequiométrica, alternando o cultivo em meio líquido e em meio solidificado com ágar (1,5 %).

Para o enriquecimento, foi utilizado o meio de cultura Zinder (Zinder *et al.*, 1984), sem fonte de carbono e sem cloreto de amônio. O meio foi preparado pela dissolução dos itens listados na tabela 6 em água deionizada. A atmosfera dos frascos foi preenchida com mistura padrão dos gases N_2:CO_2 (70:30%) para expulsão do oxigênio e manutenção do pH, selados com tampas de alumínio e esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm durante 20 minutos.

Tabela 6. Composição do meio de cultura Zinder modificado.

Componentes	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Fosfato de Potássio (K_2HPO_4)	400
Cloreto de Magnésio hidratado ($MgCl_2.6H_2O$)	1000
Cloreto de Cálcio hidratado ($CaCl_2.2H_2O$)	100

Fonte: Zinder et al. (1984)

Ao meio esterilizado, foram adicionados os demais componentes, a partir de soluções estoque estéreis, nas concentrações apresentadas na tabela 7. Para os ensaios de enriquecimento, foi utilizada a condição de excesso de sulfeto, na relação N/S de 0,8, a fim de evitar limitações de crescimento devido a perdas sulfeto.

Tabela 7. Componentes adicionados ao meio Zinder esterilizado.

Componentes	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Nitrato de Potássio (KNO_3)/ Nitrito de Sódio ($NaNO_2$)	144/99
Sulfeto de Sódio hidratado ($Na_2S.9H_2O$)	450
Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$)	2000
Micronutrientes (Zinder)	100 $mL.L^{-1}$

Fonte: Zinder et al., 1984.

4.5.1. SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES

A solução de micronutrientes utilizada nos ensaios de enriquecimento e purificação foi a descrita por Zinder et al. (1984) na concentração de 100 $mL.L^{-1}$. A solução foi preparada pela dissolução dos ítens listados na tabela 8 em água deionizada e o pH foi ajustado para 6,0 – 6,2 com solução de KOH. A solução foi esterilizada por filtração em sistema Millipore em membrana de poro 0,22 µm, previamente esterilizado em autoclave. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração.

Tabela 8. Composição da solução Zinder de micronutrientes.

Componentes	Concentração ($mg.L^{-1}$)
Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA)	1,7
Sulfato de Zinco hidratado ($ZnSO_4.7H_2O$)	0,14
Cloreto de Cálcio hidratado ($CaCl_2$. 2H2O)	0,24
Cloreto de Manganês ($MnCl_2$)	0,1
Molibdato de Amônio ($(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$)	0,04
Sulfato de Cobre hidratado ($CuSO_4.H_2O$)	0,07
Cloreto de Cobalto hidratado ($CoCl_2$. $6H_2O$)	0,07

Fonte: Zinder et al., 1984.

4.5.2. SOLUÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO

A solução estoque de Bicarbonato de Sódio foi feita na concentração de 20 $g.L^{-1}$. A solução do Bicarbonato de sódio em água ultrapurificada foi esterilizada por filtração em sistema Millipore em membrana de poro 0,22 µm, previamente esterilizado em autoclave. Os frascos foram fechados com tampas de butila, lacrados e armazenados sob refrigeração.

4.5.3. SOLUÇÃO DE SULFETO DE SÓDIO HIDRATADO

A solução estoque de Sulfeto de Sódio hidratado ($Na_2S.9H_2O$) foi feita na concentração de 20 $g.L^{-1}$ de forma anaeróbia. A água ultrapurificada utilizada na solução foi fervida para expulsão do oxigênio e resfriada sob fluxo de nitrogênio. A dissolução do Sulfeto de Sódio na água anaeróbia foi realizada sob fluxo contínuo de nitrogênio e a solução foi esterilizada por filtração em sistema Millipore em membrana de poro 0,22 µm, previamente esterilizado em autoclave. Os frascos foram fechados com tampa de butila, lacrados e tiveram a atmosfera preenchida com gás nitrogênio.

4.5.4. SOLUÇÕES DE NITRATO E NITRITO

As soluções estoque de Nitrato de Potássio (KNO_3) e Nitrito de Sódio ($NaNO_2$) foram feitas nas concentrações de 90 $g.L^{-1}$, a partir da dissolução dos compostos em água ultrapurificada. As soluções foram armazenadas em frascos lacrados com tampa de butila e esterilizados a 121°C e 1 atm durante 20 minutos.

4.5.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O enriquecimento foi acompanhado pelas análises de nitrato, nitrito, sulfeto, sulfato e nitrogênio amoniacal. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005), com excessão das análises de nitrito, que foram realizadas por meio de análise por injeção de fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*), que e das análises de sulfeto dissolvido total (SDT), que foram feitas de acordo com a metodologia 8131 (azul de metileno) proposta pela HACH, com adição de acetato de Zinco 0,1 M para fixação do sulfeto presente na amostra. A Tabela 9 apresenta os parâmetros relevantes ao presente trabalho e as metodologias de análise utilizadas.

Tabela 9. Parâmetros e metodologias das análises físico-químicas.

Parâmetro/Unidade	Metodologia de análise
$N\text{-}NH_4^+$ ($mgN.L^{-1}$)	Método do Fenato (FIA)
$N\text{-}NO_2^-$ ($mgN.L^{-1}$)	Colorimétrico (FIA)
$N\text{-}NO_3^-$ ($mgN.L^{-1}$)	Espectrofotométrico UV
$S\text{-}SO_4^-$ ($mg.L^{-1}$)	Turbidimétrico
SDT ($mg.L^{-1}$)	Colorimétrico (HACH)

4.5.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA CULTURA ENRIQUECIDA

Todas as amostras foram examinadas através de microscopia óptica comum e contraste de fase, utilizando microscópio Olympus BX-60, acoplado à câmera para captura de imagens (Evolution QE, Media Cybernetics Inc., USA) utilizando software Image Pro-Plus 4.5.

A coloração de Gram foi realizada para diferenciação dos microrganismos, conforme procedimento DMS, 1981. A observação foi realizada em microscópio óptico de luz comum com objetiva de imersão.

4.6. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA CULTURA ENRIQUECIDA

Uma vez que a cultura se mostrou morfológicamente purificada, procedeu-se a caracterização molecular da cultura através da extração do DNA total, amplificação dos fragmentos rRNA 16S pertencentes ao Domínio *Bacteria* e eletroforese em gel de gradiente desnaturante, seguida do seqüenciamento do fragmento rRNA 16S da cultura e identificação do microrganismo envolvido no processo de desnitrificação autotrófica no reator estudado.

4.6.1. EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA

O DNA genômico total dos isolados foi extraído e os fragmentos rRNA 16S das amostras foram amplificados utilizando os primers específicos para bactérias desnitrificantes com o GC “clamp”, como descrito anteriormente.

4.6.2. DGGE E RECUPERAÇÃO DO DNA DAS BANDAS RECORTADAS

Os produtos amplificados foram separados por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) de 40 a 60% de poliacrilamida. As bandas correspondentes aos microorganismos desnitrificantes autotróficos presentes na cultura purificada foram recortadas do gel e o DNA foi recuperado através da imersão da banda recortada em água ultrapurificada por 24 horas.

4.6.3. SEQUENCIAMENTO DA CULTURA PURIFICADA

O fragmento rRNA 16S da cultura purificada e o DNA recuperado da banda recortada do DGGE foram reamplificados utilizando o mesmo set de primers para o Domínio *Bacteria* utilizado anteriormente (968 F e 1392 R) sem o GC "clamp". Após confimação da amplificação em gel de agarose, o produto de PCR foi purificado com o *kit Illustra GFX™ PCR DNA and GEL BAND Purification kit* da GE health care.

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando Big Dye Terminator (Applied Biosystem®) com nucleotídeos marcados. Foram utilizados 1µL de Big Dye, 2 µL de produto de PCR purificado, 1 µL de *primer*, 2 µL de tampão e 4 µL de água ultra-purificada estéril, totalizando 10 µL. Os tubos foram colocados em termociclador sob as condições apresentadas na tabela 10.

Tabela 10. Programação do termociclador para as reações de sequenciamento.

N° de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
35	94°C 15 segundos	50° C 15 segundos	60°C 4 minutos

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 45 minutos e o isopropanol foi removido dos tubos por inversão. Adicionou-se 200 µL de etanol (60 %) ao precipitado e os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm a 20°C por 5 minutos. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente, na ausência de luz até a evaporação total do etanol. Os pellets formados foram ressuspensos em 15 µL de formamida Hi- Di e submetidos a choque térmico (94°C por 4 minutos e 4°C por 4 minutos) em termociclador, para desnaturaração do DNA.

A leitura das seqüências de nucleotídeos foi realizada em analisador automático de DNA modelo ABI PRISM 310 (Applied Biosystems®).

4.6.4. ANÁLISE DAS SEQUENCIAS DE rRNA 16S

As sequências de nucleotídeos foram processadas por meio do *software* Seqman do pacote *Lasergene DNAstar* para remoção do vetor e de bases com baixa qualidade e comparadas às sequências do rRNA 16S de microrganismos representados na base de dados do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.7. OBTENÇÃO DE DADOS FISIOLÓGICOS DA CULTURA PURIFICADA

Uma série de ensaios foi realizada com o objetivo de determinar a curva-padrão de crescimento do microrganismo, sua velocidade de crescimento e velocidade de desnitrificação.

4.7.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE SULFETO DE SÓDIO PARA A MANUTENÇÃO DO pH DA CULTURA

A desnitrificação a partir de sulfeto produz alcalinidade. Um ensaio foi realizado a fim de verificar a variação do pH em diferentes concentrações de sulfeto, a fim de determinar a concentração máxima de sulfeto de sódio para a manutenção de uma faixa de pH neutro nos ensaios. Diferentes concentrações de sulfeto de sódio foram adicionadas em triplicatas ao meio zinder, com atmosfera de N_2: CO_2 (70:30%), os frascos foram mantidos sob agitação à temperatura de 30°C por 24 horas e após esse período de estabilização foi feita a análise do pH da cultura.

4.7.2. LIMITES DE INIBIÇÃO DO SULFETO NA CULTURA PURIFICADA

A avaliação dos limites de inibição do crescimento pelo sulfeto foi realizada na condição de redução de nitrato com relação N/S igual a 0,8. O limite mínimo avaliado foi a concentração de 12 mg.L^{-1} de N-NO_3^- e 15 mg.L^{-1} de S^{2-}. O limite máximo avaliado foi de 182 mg.L^{-1} de N-NO_3^- e 227 mg.L^{-1} de S^{2-}. Às triplicatas das diferentes concentrações foram adicionadas igual concentração inicial de biomassa e após 72 horas os frascos foram avaliados quanto a

produção de biomassa e consumo de nitrato. Com esses dados foi possível calcular o rendimento celular (Y) utilizando a equação 4.4.

$$Y = \frac{dSSV}{dN} \tag{4.4}$$

Onde:

Y = rendimento celular em função do consumo de nitrogênio (g SSV.gN^{-1});
dSSV= Variação da concentração de biomassa ($g.L^{-1}$);
dN= Variação na concentração de nitrogênio ($g.L^{-1}$).

4.7.3. CURVA-PADRÃO DE CRESCIMENTO CELULAR DA CULTURA PURIFICADA.

A curva-padrão de crescimento da cultura desnitrificante autotrófica purificada teve que ser realizada utilizando a variação de biomassa a partir da análise de Sólidos Solúveis Voláteis (SSV). O enxofre elementar que se acumula na cultura impediu o acompanhamento preciso do aumento da absorbância ao longo do tempo, método usualmente aplicado para a determinação da curva-padrão de crescimento.

Como a cultura foi cultivada em condição autotrófica, a quantidade de biomassa produzida foi pequena e a medição de SSV teve que ser realizada utilizando um volume grande de cultura. Para isso, a curva-padrão teve que ser realizada utilizando 30 frascos de 500 mL, contendo 200 mL de volume final de meio. Os meios foram inoculados com 40 mL (20%) de uma cultura ativa com concentração conhecida de 50 $mg.L^{-1}$ de SSV e incubados a 30°C.

Os pontos amostrais da curva tiveram como base as 72 horas do ensaio de determinação das concentrações limites do sulfeto, sendo estabelecidos os seguintes tempos amostrais: 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 54, 60 e 72 horas. Para cada tempo amostral foram utilizados três frascos aleatórios para a determinação dos SSV, segundo APHA/AWWA (2005). A curva de crescimento da biomassa foi obtida utilizando os software Origin versão 7.0 e Excel 2007.

4.7.4. VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DA CULTURA PURIFICADA

A velocidade específica de crescimento (μ_x) representa a taxa de crescimento (dX/dt) por unidade de biomassa (X), e foi calculada para cada período de tempo da curva-padrão de crescimento a partir da equação 4.5.

$$\mu_x = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt} \tag{4.5}$$

Onde:

μ_x = velocidade específica de crescimento celular (h^{-1});
X= unidade de biomassa (SSV) média no intervalo de tempo;
t= tempo (h)

A maior velocidade específica encontrada corresponde à velocidade específica máxima de crescimento da cultura. Substituindo a velocidade específica máxima de crescimento na equação 4.6 temos o tempo de duplicação do microrganismo desnitrificante autotrófico isolado.

$$t_d = \frac{ln2}{\mu_{máx}} \tag{4.6}$$

Onde:

td = tempo de duplicação (h);
$\mu_{máx}$= velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}).

4.7.5. VARIAÇÃO TEMPORAL DOS SUBSTRATOS

A cada tempo amostral da curva de crescimento também foram determinadas as concentrações de nitrato, nitrogênio amoniacal, sulfeto, sulfato e pH. A tabela 11 traz as concentrações iniciais teóricas do ensaio.

Tabela 11. Concentrações teóricas iniciais do ensaio para determinação da variação temporal dos substratos.

$N\text{-}NO_3^-$	160 $mg.L^{-1}$
SDT	200 $mg.L^{-1}$
$N\text{-}NH_4^+$	0
$S\text{-}SO_4^{2-}$	0
pH	7,0

4.7.6. VELOCIDADE ESPECÍFICA DE UTILIZAÇÃO DO NITRATO.

A velocidade específica de utilização do nitrato (q) corresponde o quanto cada unidade de biomassa (X) utiliza de substrato em um determinado tempo, calculado utilizando a equação 4.7.

$$q_N = \frac{1}{x}\frac{dN}{dt} \tag{4.7}$$

Onde:

q_N = velocidade de redução do $N\text{-}NO_3^-$ ($gN.SSV^{-1}.h^{-1}$);

d_N = variação da massa de $N\text{-}NO_3^-$ no intervalo $t_{(n-1)}$ e $t_{(n)}$ (mg);

X= SSV médio no intervalo de tempo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DIVERSIDADE BACTERIANA DOS REATORES

Os reatores foram inoculados com o lodo de reator anaeróbio tratando efluente de um abatedouro de aves. O lodo é reconhecido por sua diversidade microbiana, e já foi utilizado anteriormente no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) como inóculo para o enriquecimento de uma comunidade desnitrificante autotrófica (Moraes, 2009).

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foi utilizada para a avaliação do enriquecimento da comunidade bacteriana nos reatores operados nas condições de redução de nitrato e redução de nitrito, em comparação à comunidade que já estava presente no lodo inoculado no reator.

Apesar das limitações apresentadas pela técnica, o DGGE nos traz informações interessantes quanto à comunidade bacteriana presente no lodo anaeróbio inoculado e na comunidade enriquecida nos reatores. A figura 3 traz a imagem do DGGE e as informações quanto à sequência das amostras.

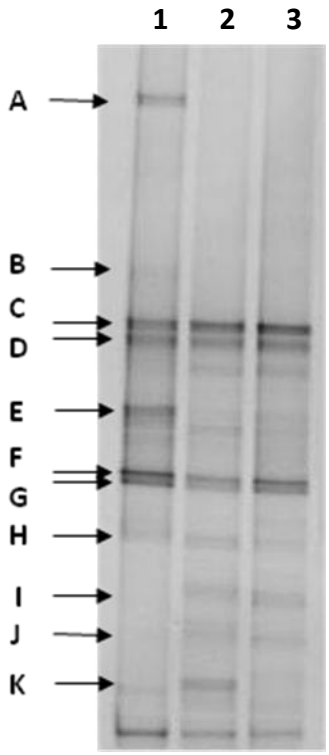


Figura 3. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40-60 %) utilizando *primers* para o Domínio *Bacteria*, onde a amostra 1 corresponde ao inóculo dos reatores, a amostra 2 corresponde ao lodo do reator na condição de redução de nitrato utilizando sulfeto como doador de elétrons e a amostra 3 corresponde ao lodo do reator na condição de redução de nitrito utilizando sulfeto como doador de elétrons.

É possível observar que a amostra 1, correspondente ao inóculo do reator anaeróbio do abatedouro de aves, possui uma baixa diversidade bacteriana. Apesar disso, o lodo da Avícola Dakar já foi utilizado com sucesso na inoculação de reatores operados em condição de desnitrificação autotrófica, sugerindo que os efluentes de tratamento anaeróbio, contendo compostos nitrogenados, baixa concentração de matéria orgânica prontamente biodegradável e escassez de oxigênio favoreçam a manutenção de microrganismos desnitrificantes autotróficos facultativos ou estritos.

O cálculo do coeficiente de similaridade de Gillan indicou que as comunidades presentes nos reatores possuíam aproximadamente 50% de similaridade com a comunidade presente no momento de inoculação dos reatores, enquanto que os reatores operados nas condições de redução de nitrato e nitrito apresentam aproximadamente 90% de similaridade entre si. Esses resultados indicam que aproximadamente metade das espécies de bactérias que

foram detectadas pelo método do DGGE, se manteve nos reatores desnitrificantes autotróficos e que a comunidade enriquecida nos dois reatores é bastante semelhante.

Considerando as limitações associadas à técnica do DGGE pode-se supor que alguns microrganismos presentes no inóculo não obtiveram sucesso em se manter nos reatores, como sugere as linhas A, B e E. Podem se tratar de bactérias heterotróficas obrigatórias, que não foram favorecidas pela condição de escassez de matéria orgânica nos reatores.

Alguns microrganismos se mantiveram favorecidos na comunidade do reator, como mostram as linhas C, D, F e G. São bactérias autotróficas ou heterotróficas facultativas, capazes de se manter nas condições de desnitrificação autotrófica ou pela utilização da matéria orgânica devido à morte celular nos reatores.

O padrão de bandas da linha H sugere a presença de microrganismos que foram favorecidos pela condição desnitrificante autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons, mas que não foram capazes de reduzir nitrito.

Alguns microrganismos não foram detectados pelo DGGE na coluna do inóculo, mas aparecem nas comunidades dos reatores, comprovando o enriquecimento da comunidade bacteriana em ambos os reatores avaliados.

5.2. COMUNIDADE DESNITRIFICANTE AUTOTRÓFICA

A quantificação da comunidade desnitrificante autotrófica teve como objetivo verificar a presença de microrganismos capazes de realizar desnitrificação autotrófica utilizando o sulfeto como doador de elétrons no inóculo dos reatores e também avaliar o enriquecimento desses microrganismos nos reatores operados nas condições de redução de nitrato em condição estequiométrica de sulfeto, redução de nitrato em condição de excesso de sulfeto e redução de nitrito em condição estequiométrica de sulfeto. A figura 4 traz os resultados do NMP de desnitrificantes autotróficas por 100 mL da cultura.

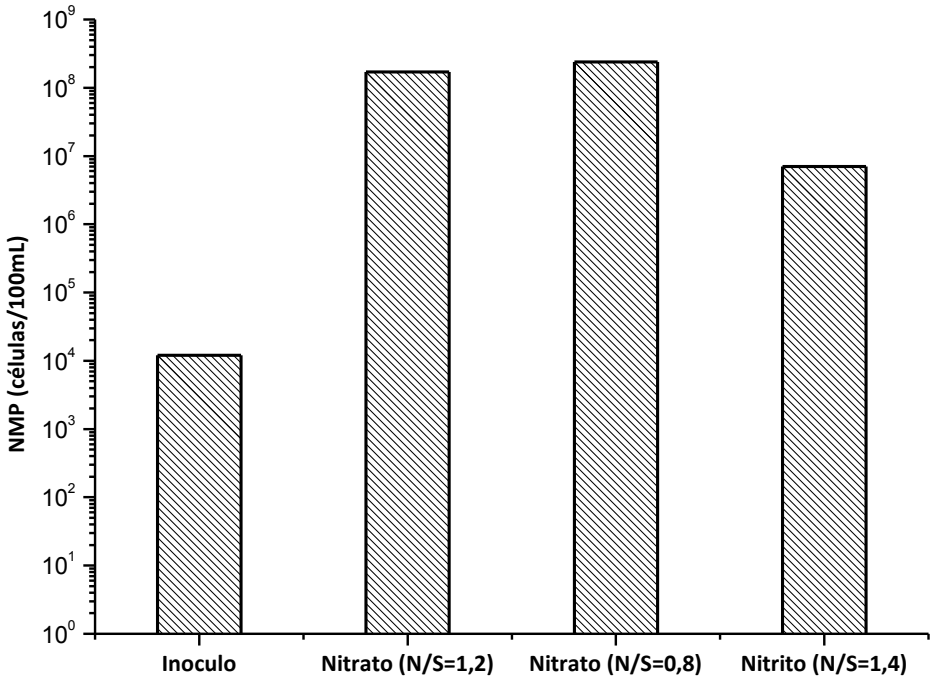


Figura 4. NMP de células desnitrificantes autotróficas em 100 mL da cultura do inóculo e o lodo enriquecido dos reatores nas condições de redução autotrófica de nitrato e nitrito em diferentes relações N/S.

A partir da figura, é possível observar que o lodo anaeróbio que serviu como inóculo para os reatores possui uma quantidade considerável de microrganismos desnitrificantes autotróficos ($1,2.10^4$ cel.mL^{-1}), e que a cultura desnitrificante autotrófica presente no inóculo foi enriquecida nas três condições de operação dos reatores.

Os reatores operados na condição de redução de nitrato apresentaram maiores valores de NMP de células desnitrificantes autotróficas, indicando maior enriquecimento. A pequena diferença existente entre o NMP para a condição N/S estequiométrica ($1,7.10^8$ cel. mL^{-1}) e o NMP para a condição N/S de excesso de sulfeto ($2,4.10^8$ cel. mL^{-1}) pode estar relacionada a perdas de sulfeto na forma de H_2S volátil durante a manipulação dos frascos, e consequente limitação do crescimento na condição N/S estequiométrica, sugerindo que a condição de

excesso de sulfeto apresenta vantagens no enriquecimento da cultura desnitrificante autotrófica.

O menor número de células no NMP de células desnitrificantes autotróficas no reator operado na condição de redução de nitrito ($0,7.10^7$ cel.mL^{-1}) pode estar relacionado à menor quantidade de energia liberada na redução do nitrito. Desse modo, a condição de redução de nitrato na condição de excesso de sulfeto foi tida como melhor condição e aplicada como condição padrão para os ensaios de purificação e estudos fisiológicos da cultura desnitrificante autotrófica.

5.3. OBTENÇÃO DA CULTURA AUTOTRÓFICA DESNITRIFICANTE PURIFICADA

O ensaio de purificação teve início a partir do ensaio de NMP da condição de redução de nitrato com relação N/S com excesso de sulfeto. A maior diluição positivada foi utilizada como inóculo para a purificação. A cultura foi transferida para um frasco contendo meio de cultura desnitrificante autotrófico com condição N/S = 0,8 (excesso de sulfeto) na concentração de 10% de inóculo.

Após subseqüentes transferências da cultura e comprovação da desnitrificação pelo decaimento na concentração do composto nitrogenado e formação de sulfato, a cultura foi transferida para meio sólido (1,4% de ágar) contendo a mesma composição do meio líquido, com exceção do composto reduzido de enxofre, uma vez que, ao invés de sulfeto de sódio ($Na_2S.9H_20$), utilizou-se tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$). As placas foram lacradas com filme plástico para dificultar a entrada de oxigênio e incubadas a 30°C.

Uma colônia isolada no meio sólido foi coletada com auxílio de alça de platina estéril e inoculada em meio líquido fresco. Esse procedimento de transferência alternada do meio sólido para o meio líquido foi repetido até que a placa apresentasse somente colônias de morfologia semelhante.

O crescimento em meio sólido mostrou pequenas colônias esbranquiçadas e fortemente aderidas ao meio de cultura. Em algumas placas, o meio de cultura adquiriu coloração

esverdeada, possivelmente devido à formação de enxofre elementar a partir da oxidação do sulfeto.

5.3.1. MICROSCOPIA E COLORAÇÃO DE GRAM

A purificação foi observada através de microscopia óptica comum e também pela coloração de Gram da cultura. A figura 5 apresenta algumas das fotos realizadas durante o estudo. As figuras 5a e 5b se referem à comunidade enriquecida presente no reator desnitrificante anaeróbio após um mês de operação. As figuras 5c e 5d se referem à cultura já purificada, apresentando apenas pequenos bacilos. As figuras 5e e 5f se referem à coloração de Gram feita utilizando esfregaço da cultura purificada.

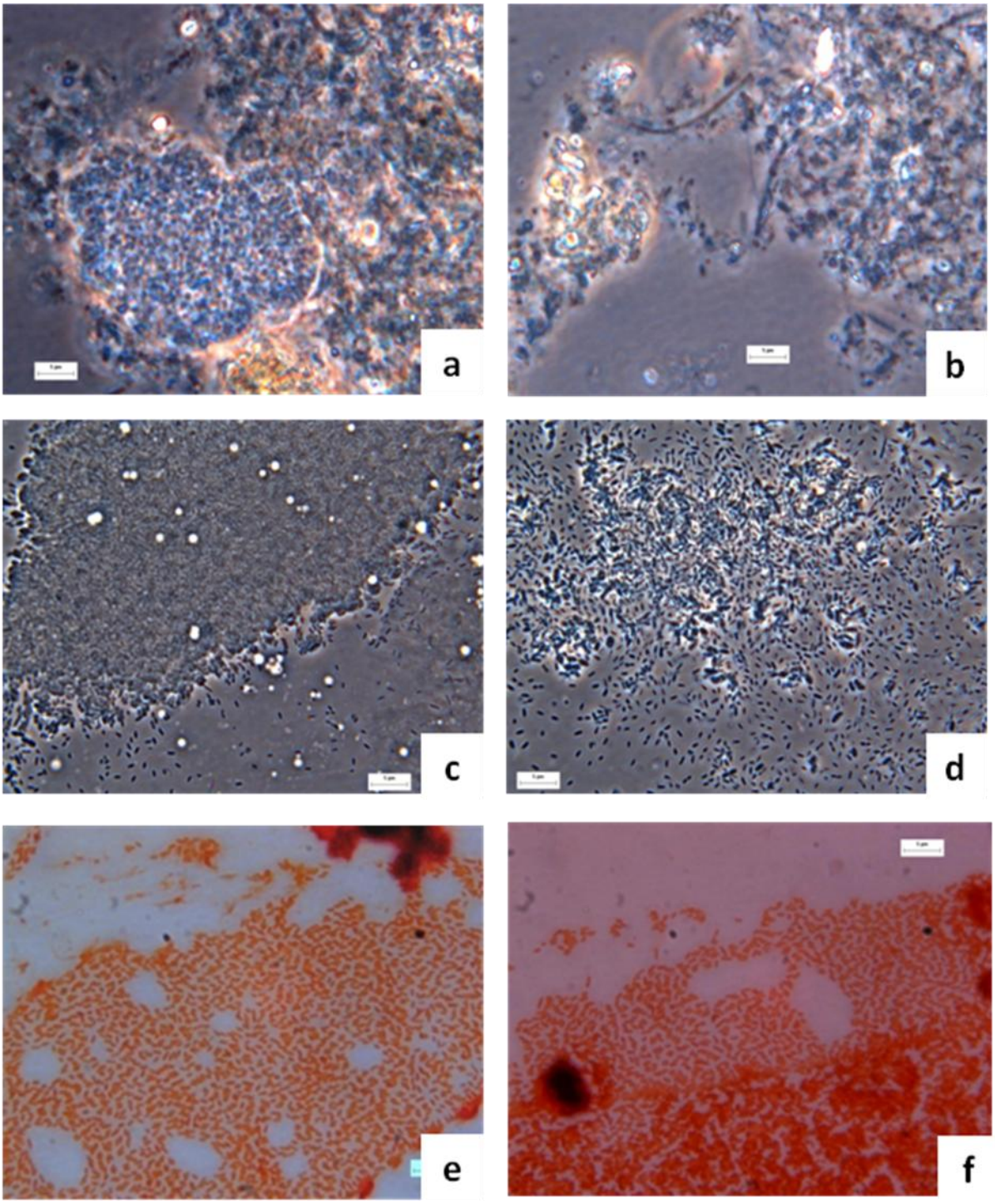


Figura 5: Microscopia óptica de amostras dos reatores (Aumento de 2000x). Figuras 5a e 5b são amostras do reator operado na condição de redução de nitrato e excesso de sulfeto após um mês de operação. Figuras 5c e 5d são amostras da cultura purificada. Figuras 5e e e 5f são colorações de gram da cultura purificada.

Após um mês de operação do reator desnitrificante autotrófico sob condição de redução de nitrato com relação N/S de sulfeto em excesso (figuras 5a e 5b), a cultura ainda apresentava várias morfologias celulares, podendo ser observados cocos, bacilos e filamentos. É possível observar, na figura 5ª, um aglomerado de pequenos bacilos, com estrutura semelhante ao aglomerado de bacilos presente na figura 5c.

As figuras 5c e 5d sugerem que a cultura se encontra purificada, com presença de pequenos bacilos que podem ser observados sozinhos ou em aglomerados. A partir da coloração de Gram (figuras 5e e 5f), foi possível observar a predominância de microrganismos Gram negativos, confirmando a purificação da cultura.

5.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA CULTURA PURIFICADA

Os fragmentos rRNA 16S da cultura purificada foram amplificados utilizando *primers* específicos para o Domínio Bacteria e separados por meio de DGGE. A cultura se separou em duas bandas principais, como mostra a figura 6.

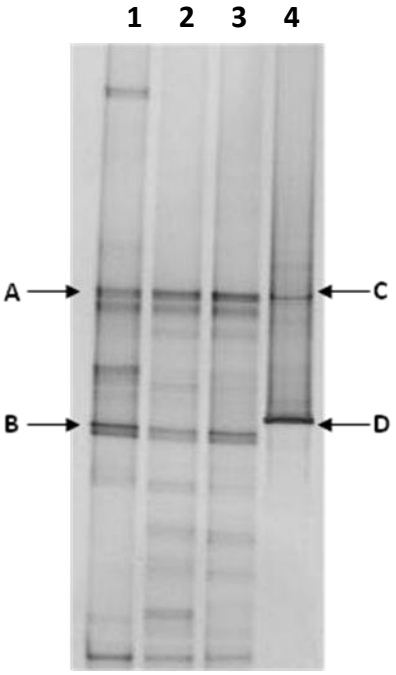


Figura 6. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (40-60 %) utilizando primers para o Domínio Bacteria, onde a amostra 1 corresponde ao inóculo dos reatores, a amostra 2 corresponde ao lodo do

reator na condição de redução de nitrato utilizando sulfeto como doador de elétrons e a amostra 3 corresponde ao lodo do reator na condição de redução de nitrito utilizando sulfeto como doador de elétrons e a amostra 4 corresponde à cultura purificada.

A banda D foi recortada do gel e o DNA da banda foi recuperado e reamplificado utilizando o mesmo set de primers (968F – 1392R) sem o GC "*clamp*" para a reação de sequenciamento. Somado a isso, o DNA total da cultura purificada também foi amplificado com os *primers* para o Domínio *Bacteria* sem o GC "*clamp*".

Os fragmentos rRNA 16S da banda D e da cultura purificada foram sequenciadas e relacionadas ao microrganismo *Pseudomonas stutzeri.* O anexo 1 traz o diagrama dos sequenciamentos. A tabela 12 traz as informações da comparação das seqüências do rRNA 16S com as sequencias representadas na base de dados do GenBank.

Tabela 12: Informação das seqüências obtidas a partir da cultura purificada (C) e da banda recortada do DGGE (B) com *primers* para o Domínio *Bacteria* em comparação com seqüências representadas na base de dados do GenBank.

Amostra	Microrganismo	N° de acesso	Similaridade	Referência
B	*Pseudomonas stutzeri*	HM030755	99%	Gao et al., 2010 (Não publicado)
C	*Pseudomonas stutzeri*	HM245963	100%	(Arkatkar *et al.*)

O sequenciamento identificou o fragmento de aproximadamente 424pb do gene rRNA 16S (100%) da bactéria *Pseudomonas stutzeri* na cultura purificada e 99% do gene rRNA 16S de *Pseudomonas stutzeri*. Esses resultados mostram que a cultura está purificada.

Pseudomonas spp. são bactérias chamadas de r-estrategista, que possuem rápido desenvolvimento e alta reprodutibilidade, e são conhecidas por possuírem mais de uma

sequência para o gene rRNA 16S. Sendo assim, as bandas C e D podem corresponder ao mesmo microrganismo, são duas cópias diferentes do fragmento de rRNA 16S.

Pseudomonas stutzeri pertence à classe y-Proteobactéria. Diversas linhagens de *Pseudomonas stutzeri* foram identificadas como desnitrificantes em ambientes naturais e tem recebido particular atenção pelas propriedades metabólicas de degradação do compostos aromáticos. A espécie é amplamente distribuída no meio ambiente, ocupando diversos nichos ecológicos (Lalucat *et al.*, 2006).

Mahmood et al. (2009), isolou a linhagem QZ1 de *Pseudomonas stutzeri* a partir de um reator anóxico oxidador de sulfeto. A linhagem é autotrófica facultativa e utiliza sulfeto como doador de elétrons na redução de nitrito.

O alinhamento do fragmento da cultura purificada com a sequência de nucleotídeos da linhagem QZ1 de *Pseudomonas stutzeri* depositada no genBank sob número de acesso EF542804 mostrou identidade de 100% entre os dois fragmentos, como mostra a figura 8.

```
>lcl|52923
Length=1454

 Score =  638 bits (345),  Expect = 0.0
 Identities = 345/345 (100%), Gaps = 0/345 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCG  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1002  TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCG  1061

Query  61    CAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1062  CAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTAAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGA  1121

Query  121   CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1122  CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACA  1181

Query  181   CACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1182  CACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATA  1241

Query  241   AAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1242  AAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAG  1301

Query  301   TAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  345
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1302  TAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  1346
```

Figura 8. Alinhamento entre os fragmentos da cultura purificada e da sequência depositada no GenBank da linhagem QZ1 de *Pseudomonas stutzeri.*

Na figura 9 está representada a árvore filogenética com diferentes espécies do gênero Pseudomonas, incluindo a sequência da linhagem QZ1 de *Pseudomonas stutzeri* .

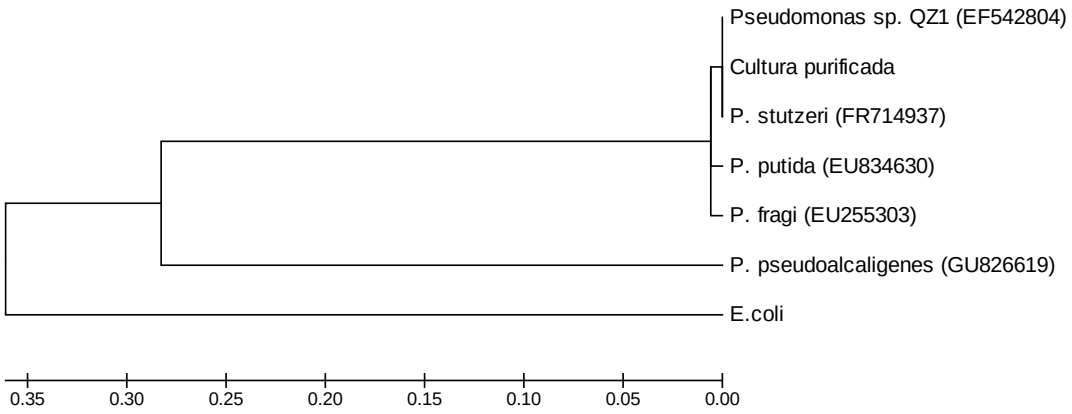


Figura 9. Árvore filogenética de diferentes espécies do gênero Pseudomonas. O número de acesso dos dados está apresentado entre parênteses após o nome da espécie. A barra de escala demonstra a distância filogenética.

A espécie *Pseudomonas stutzeri* apresenta vantagens no povoamento de reatores desnitrificantes autotróficos. A versatilidade na utilização de diferentes fontes de carbono aumenta as possibilidades de sucesso desses microrganismos em relação aos microrganismos desnitrificantes oxidadores de sulfeto estritamente autotróficos, como as espécies *Thiobacillus denitrificans* e *Thiomicrospira denitrificans*.

A quantificação do lodo anaeróbio utilizado como inóculo dos reatores mostrou resultados que indicaram uma população considerável de microrganismos capazes de crescer em condições estritamente autotróficas. Considerando as limitações da técnica de DGGE, pode-se supor que as bandas C e D estão relacionadas com as bandas A e B.

A diferença de altura das bandas B e D poderia ser explicada por pequenas variações na sequência das bases, que podem ocorrer na reação de PCR devido a problemas de infidelidade da *Taq Polimerase*. A única maneira de comprovar a relação seria através do sequenciamento das bandas A e B.

5.5. ESTUDOS FISIOLÓGICOS DA CULTURA PURIFICADA

5.5.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE SULFETO DE SÓDIO PARA A MANUTENÇÃO DO PH DA CULTURA.

O bicarbonato de sódio adicionado ao meio foi capaz de manter o pH neutro até a concentração de 150 $mg.L^{-1}$ de sulfeto na forma de sulfeto de sódio. Considerando que a maioria dos microorganismos cresce em pH neutro, a concentração de 200 $mg.L^{-1}$ foi considerada a concentração máxima de sulfeto de sódio para a manutenção do pH na faixa de 7,0 a 8,0. A figura 7 apresenta a variação do pH nas diferentes concentrações de sulfeto analisadas.

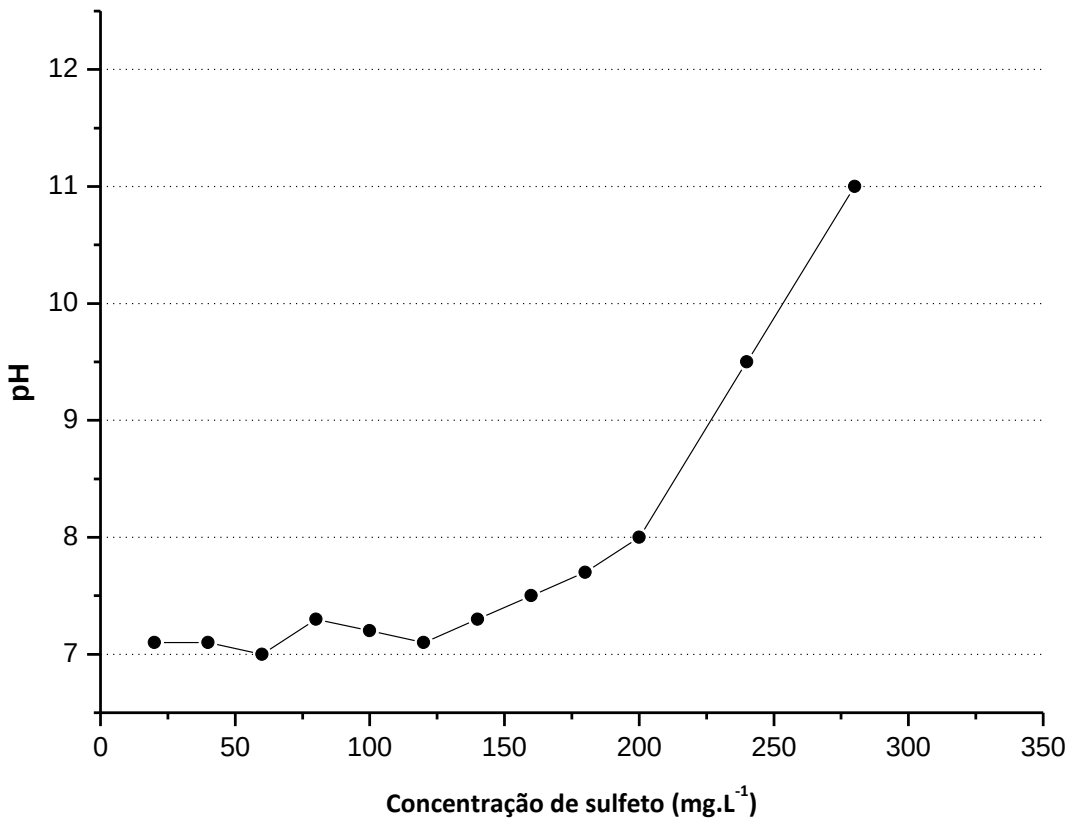


Figura 7: Gráfico de variação do pH para diferentes concentrações de sulfeto de sódio hidratado.

5.5.2. LIMITES DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO PELOS SUBSTRATOS.

O coeficiente de produção celular (Y) da cultura foi de 0,152 ± 0,006 g SSV por 1,0 g de N-NO^{3-} para as concentrações avaliadas. A tabela 13 apresenta a média das triplicatas para as concentrações iniciais e finais de SSV, nitrato e SDT, e também os valores de coeficiente de produção celular em cada ensaio.

Tabela 13: Média das triplicatas para as concentrações iniciais (C_o) e finais (C_f) de N-NO_3^- e SSV para o cálculo da produção celular Y (g SSV. g N^{-1}).

Co N ($g.L^{-1}$)	Cf N ($g.L^{-1}$)	SSVi ($g.L^{-1}$)	SSVf ($g.L^{-1}$)	Y (g SSV/ g N)
0,012	0,000	0,01	0,0118	0,150
0,02	0,000	0,01	0,0130	0,150
0,039	0,000	0,01	0,0161	0,156
0,064	0,000	0,01	0,0200	0,156
0,082	0,000	0,01	0,0220	0,146
0,102	0,000	0,01	0,0260	0,156
0,118	0,002	0,01	0,0270	0,147
0,143	0,006	0,01	0,0310	0,153
0,155	0,002	0,01	0,0340	0,157
0,182	0,042	0,01	0,0310	0,150

A partir desses dados pode-se concluir que não foram atingidas as concentrações inibitórias de sulfeto. Como a concentração máxima de sulfeto foi identificada anteriormente como sendo 200 $mg.L^{-1}$ e o aumento na concentração de sulfeto não limitou o crescimento da cultura, os ensaios para determinação da curva de crescimento e curvas de consumo foram realizadas utilizando as concentrações teóricas de 160 $mg.L^{-1}$ de N-NO_3^{-1} e 200 $mg.L^{-1}$ de S^{2-}.

5.5.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E CONSUMO DOS SUBSTRATOS

O valor inicial de SSV para os ensaios de crescimento celular e consumo dos substratos foi de 0,01 $g.L^{-1}$ e o crescimento atingiu valor máximo de 0,033 $g.L^{-1}$ após 72 horas de cultivo. Os frascos foram alimentados com concentrações iniciais de 155 $mg.L^{-1}$ de $N\text{-}NO_3^-$ e 195 $mg.L^{-1}$ de S^{2-} na forma de $Na_2S.9H_2O$ e após 60 horas a concentração de $N\text{-}NO_3^-$ já havia sido reduzida a menos de 5% da concentração inicial. A curva de crescimento foi monitorada em intervalos médios de 6 horas, e os valores obtidos foram ajustados ao modelo Boltzmann utilizando os softwares Origin versão 7.0 e Excel 2007. A tabela 14 traz os valores de SSV médios das triplicatas nos tempos de amostragem e a figura 8 traz a curva-padrão de crescimento ajustada.

Tabela 14: Valores de SSV obtidos nas triplicatas e SSV médio nos tempos de amostragem.

tempo (h)	SSV1($g.L^{-1}$)	SSV2($g.L^{-1}$)	SSV3($g.L^{-1}$)	SSV ($g.L^{-1}$)
0	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
6	0,0105	0,095	0,0100	0,0100
12	0,0110	0,0102	0,0118	0,0110
18	0,0131	0,0133	0,0134	0,0132
24	0,158	0,160	0,162	0,0160
30	0,200	0,197	0,205	0,0200
36	0,255	0,244	0,249	0,0250
48	0,307	0,315	0,320	0,0315
54	0,325	0,326	0,326	0,0325
60	0,328	0,332	0,329	0,0330
72	0,330	0,338	0,334	0,0335

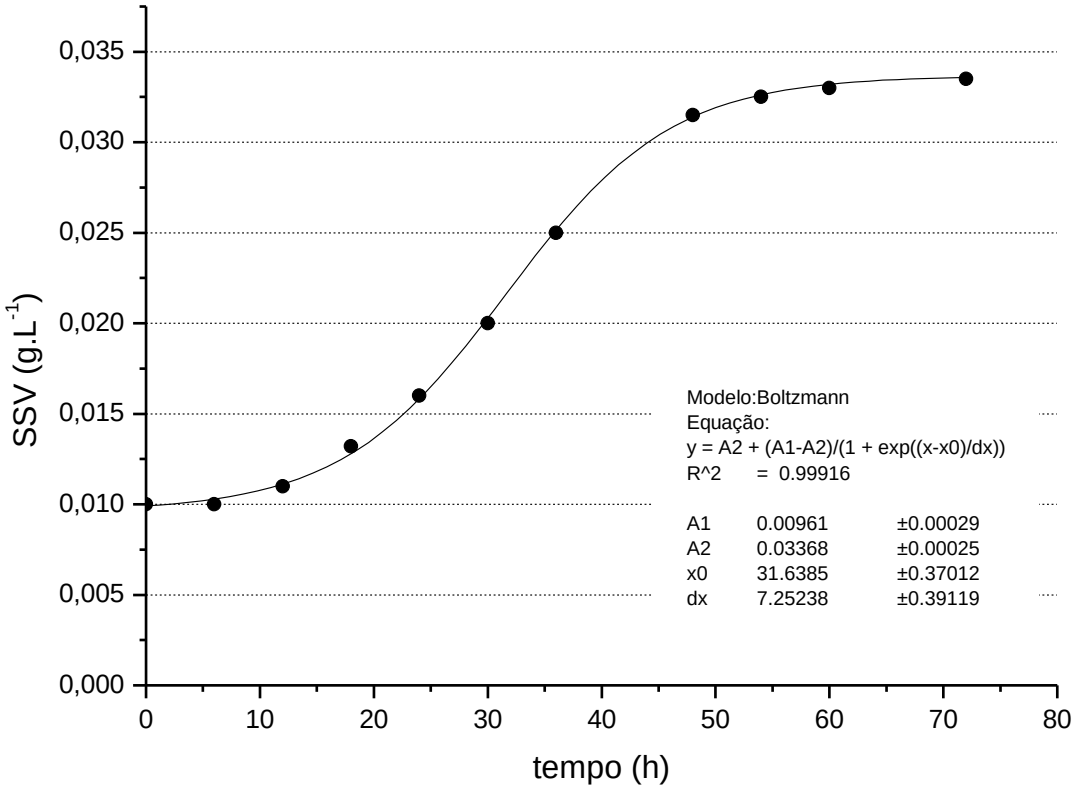


Figura 8: Curva-padrão de crescimento da cultura purificada em relação ao tempo. A curva foi ajustada ao modelo de Boltzmann, com coeficiente de correlação de 0,99.

A partir dos dados obtidos, calculou-se a taxa específica de crescimento para cada intervalo de tempo da curva se crescimento. Os valores obtidos estão na tabela 15. O gráfico 9 representa a variação temporal da taxa específica de crescimento (μ_x).

Tabela 15: Taxa específica de crescimento para cada intervalo de tempo da curva-padrão de crescimento.

tempo (h)	SSV ($g.L^{-1}$)	N ($g.L^{-1}$)	μx (h^{-1})
0	0,0100	0,1550	
6	0,0100	0,1550	0,0000
12	0,0110	0,1490	0,0159
18	0,0132	0,1340	0,0303
24	0,0160	0,1150	0,0320
30	0,0200	0,0890	0,0370
36	0,0250	0,0560	0,0370
48	0,0315	0,0130	0,0192
54	0,0325	0,0065	0,0052
60	0,0330	0,0035	0,0025
72	0,0335	0,0005	0,0013

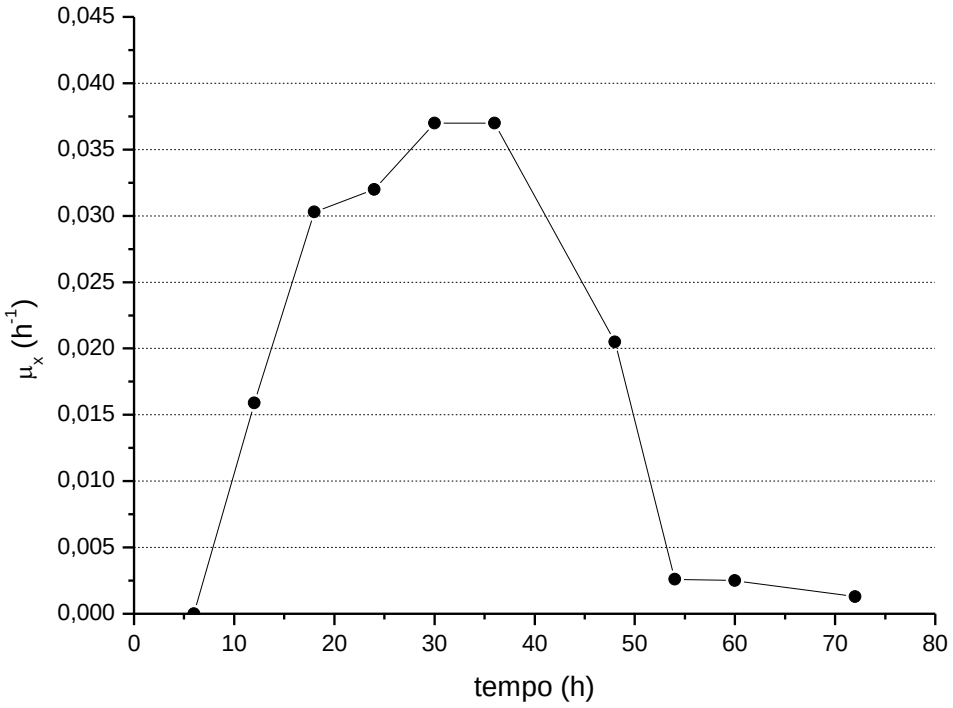


Figura 9: Representação gráfica da variação temporal da taxa específica de crescimento (μ_x).

Dos dados de crescimento específico para cada intervalo obteve-se que a taxa específica máxima de crescimento da cultura de *Pseudomonas stutzeri*, nas condições avaliadas, foi de 0,037 h-1, significando um tempo de duplicação de 18,7 horas. Esses resultados são muito semelhantes aos descritos para a linhagem QZ1 de *Pseudomonas stutzeri*, que apresentou taxa específica máxima de crescimento de 0,035 h-1 e um tempo de duplicação de 21,5 horas (Mahmood *et al.*, 2009).

Durante a curva de crescimento, a cultura foi avaliada quanto ao consumo de nitrato e sulfeto dissolvido total (SDT) e quanto à produção de sulfato. As concentrações de nitrito, nitrogênio amoniacal e pH foram avaliadas para acompanhamento do processo. Os dados de consumo do nitrato e do sulfeto, e a formação de sulfato estão apresentados na figura 10. Durante o período avaliado, não houve acúmulo de nitrito e os níveis de nitrogênio amoniacal se mantiveram estáveis, indicando que não houve redução dissimilativa de nitrato à amônia (RDNA). O pH se manteve entre 7,5 e 8,0 durante as 72 horas avaliadas.

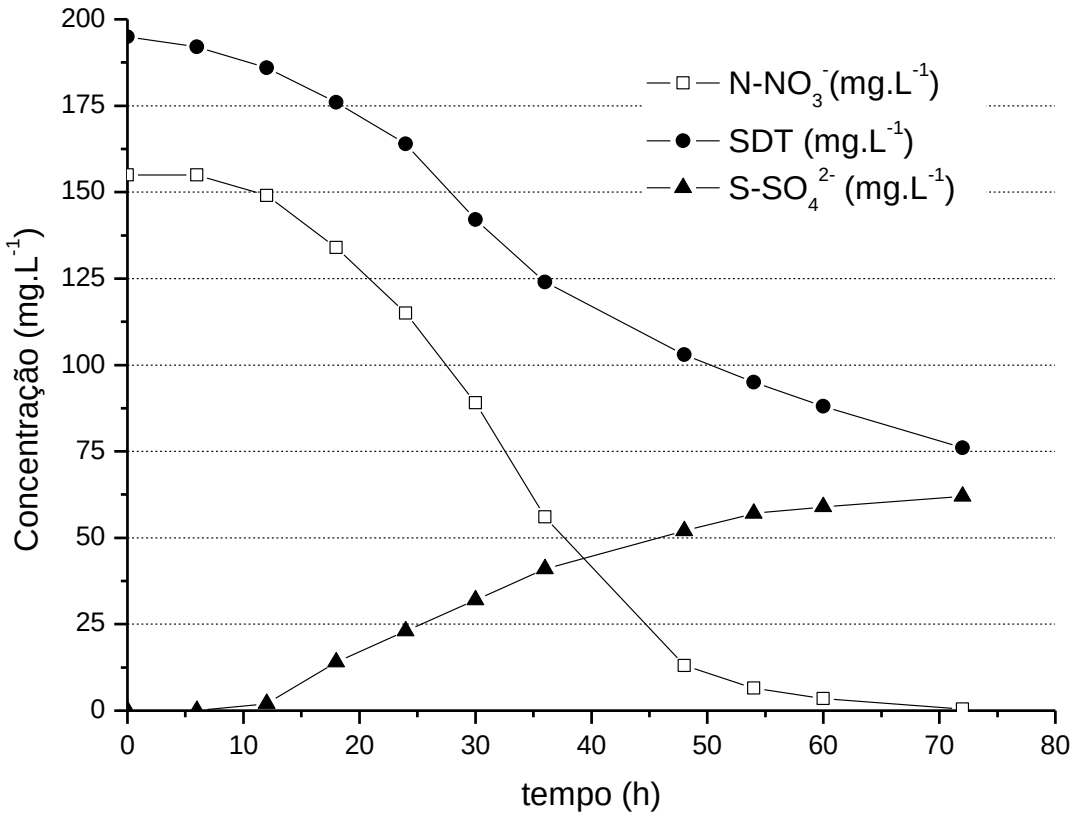


Figura 10: Variação temporal das concentrações de nitrogênio e sulfeto e formação de sulfato.

A figura mostra a redução de 97,5% do $N\text{-}NO_3^-$ inicial nas 72 horas de avaliação. O sulfeto dissolvido total (SDT) foi reduzido a 39% da concentração inicial, um resultado já esperado devido ao excesso na concentração de sulfeto inicial. A concentração formada de sulfato não correspondeu à concentração oxidada de sulfeto, provavelmente devido à formação de compostos intermediários, como o enxofre elementar.

A partir desses dados, foi possível calcular a taxa específica de desnitrificação (q) da cultura purificada para cada intervalo de tempo, obtendo velocidade máxima de desnitrificação de 0,024 g $N\text{-}NO_3^-$. $gSSV^{-1}.h^{-1}$.

Apesar de a linhagem QZ1 isolada por Mahmood (2009), utilizando nitrito como receptor de elétrons, ter apresentado o mesmo tempo de duplicação da cultura purificada neste estudo, a velocidade máxima de desnitrificação observada por aqueles autores foi menor que a calculada para a cultura purificada, indicando um menor rendimento celular, devido, principalmente, à menor liberação de energia pela redução do nitrito.

6. CONCLUSÕES

- É possível enriquecer uma comunidade desnitrificante autotrófica a partir do lodo de efluentes anaeróbios nas condições de redução autotrófica de nitrato e nitrito.
- O reator enriquecido na condição de redução de nitrito apresentou menor concentração de bactérias desnitrificantes autotróficas, provavelmente devido à menor energia liberada na redução do nitrito.
- A condição de excesso de sulfeto não afetou o enriquecimento da cultura, isso torna a condição de redução de nitrato com sulfeto em excesso a melhor condição para a desnitrificação autotrófica, do ponto de vista biológico.
- O microrganismo *Pseudomonas stutzeri* foi isolado a partir do reator desnitrificante autotrófico. A linhagem foi capaz de realizar desnitrificação associada à oxidação de sulfeto em condições estritamente autotróficas.
- A cultura apresentou tempo de duplicação de 18,7 horas ($\mu_{máx}$ de 0,037 h^{-1}), rendimento celular (Y) de 0,15 gSSV. gN^{-1} e velocidade de desnitrificação de 0,24 gN. $gSSV^{-1}$. h^{-1}.
- Os dados indicam a versatilidade deste microrganismo e a viabilidade de sua aplicação no processe de desnitrificação autotrófica utilizando sulfeto como doador de elétrons.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn, Y.H. (2006) Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry,* **41,** 1709-1721.

APHA/AWWA (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*

Water Environmental Federation, Washington, DC.

Arkatkar, A., Juwarkar, A.A., Bhaduri, S., Uppara, P.V. & Doble, M. Growth of Pseudomonas and Bacillus biofilms on pretreated polypropylene surface. *International Biodeterioration and Biodegradation,* **64,** 530-536.

Bae, W., Baek, S., Chung, J. & Lee, Y. (2001) Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. *Biodegradation,* **12,** 359-366.

Beristain-Cardoso, R.B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E.R., GÃ³mez, J. & Field, J.A. (2006) Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and Bioengineering,* **95,** 1148-1157.

Callado, N.H. & Foresti, E. (2000) Tratamento de esgoto doméstico com remoção de nitrogênio e fósforo em reatores sequenciais em batelada. In *Congresso Interamericano de Ingenieria Sanitaria y Ambiental.* (AIDIS ed.Porto Alegre.

Chernicharo, C. (2006) Post-Treatment Options for the Anaerobic Treatment of Domestic Wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology,* **5,** 73-92.

Chung, J. & Bae, W. (2002) Nitrite reduction by a mixed culture under conditions relevant to shortcut biological nitrogen removal. *Biodegradation,* **13,** 163-170.

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. *Re-views in Environmental Science and Biotechnology,* **5,** 3-19.

Gillan, D.C., Speksnijder, A.G.C.L., Zwart, G. & De Ridder, C. (1998) Genetic diversity of the biofilm covering Montacuta ferruginosa (mollusca, bivalvia) as evaluated by denaturing

gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology,* **64,** 3464-3472.

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.

Henshaw, P.F., Bewtra, J.K. & Biswas, N. (1998) Biological conversion of sulfide to elemental sulfur. *Indian Journal of Engineering and Materials Sciences,* **5,** 202-210.

Hirasawa, J.S. (2008) Avaliação da metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato utilizando técnicas da Biologia Molecular In *Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo*, Vol. Tese (Doutorado), pp. 114.

Janssen, A.J.H., Lettinga, G. & De Keizer, A. (1999) Removal of hydrogen sulphide from wastewater and waste gases by biological conversion to elemental sulphur. Colloidal and interfacial aspects of biologically produced sulphur particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* **151,** 389-397.

Korom, S.F. (1992) Natural denitrification in the saturated zone: a review. *Water Resources Research,* **28,** 1657-1668.

Kuenen, J.G., Robertson, L.A. & Tuovinen, O.H. eds. (1992) *The genera Thiobacillus, Thiomicrospira, and Thiosphaera.,* Springer, New York.

Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdes, E. & Palleroni, N.J. (2006) Biology of Pseudomonas stutzeri. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR,* **70,** 510-547.

Mahmood, Q., Zheng, P., Hu, B., Jilani, G., Azim, M.R., Wu, D. & Liu, D. (2009) Isolation and characterization of Pseudomonas stutzeri QZ1 from an anoxic sulfide-oxidizing bioreactor. *Anaerobe,* **15,** 108-115.

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,** 551-560.

Metcalf & Eddy (2003) *Wastewater engineering - Treatment and reuse.,* McGraw-Hill International edition, New York.

Moraes, B.S. (2009) Utilização de sulfeto como doador de elétrons para a desnitrificação autotrófica aplicada ao tratamento de esgoto sanitário. In *Escola de Engenharia de São Carlos*, Vol. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo.

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,** 695-700.

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.

Reyes-Avila, J., Razo-Flores, E. & Gomez, J. (2004) Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research,* **38,** 3313-3321.

Sakamoto, I.K., Sarti, A., Passig, F.H., Foresti, E., Campos, J.R., Zaiat, M. & Varesche, M.B. (2005) Avaliação da comunidade microbiana do Dominio Bacteria e Archaea em reatores anaeróbios tratando esgoto sanitário. In *Anais do IV Seminário do projeto temático Fapesp*, pp. 336-345. EESC-USP São Carlos.

Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. & Strous, M. (2003) New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews,* **27,** 481-492.

Speece, R.E. (1983) Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental Science & Technology,* **17,** 416A-427A.

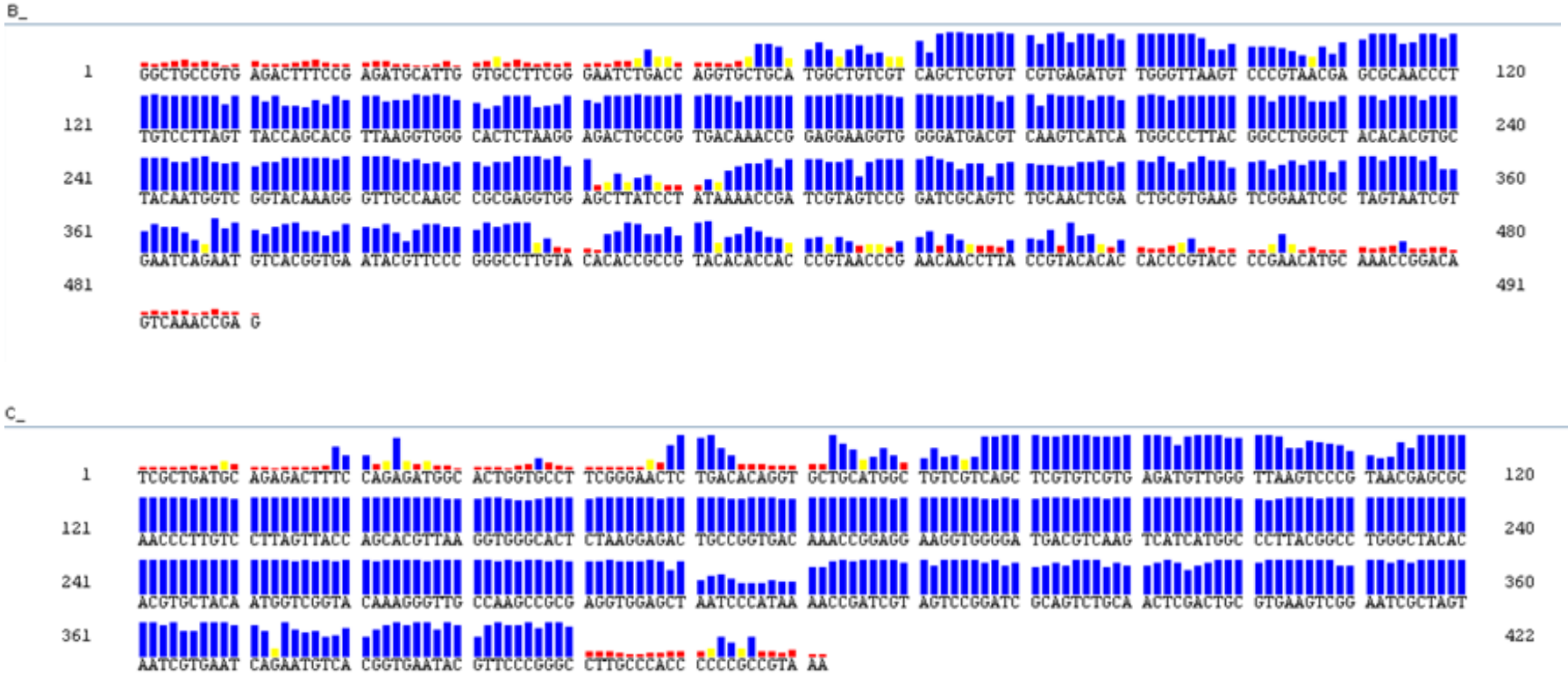
Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E. & Stahl, D.A. (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology,* **176,** 6623-6630.

Vaiopoulou, E., Melidis, P. & Aivasidis, A. (2005) Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification. *Water Research,* **39,** 4101-4109.

Wang, H. (2009) Mitigation of lake eutrophication: Loosen nitrogen control and focus on phosphorus abatement. *Progress in Natural Science*.

Wilhelm, E., Battino, R. & Wilcock, R.J. (1977) Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chemical Reviews,* **77,** 219-262.

Zinder, S.H., Cardwell, S.C. & Anguish, T. (1984) Methanogenesis in a thermophilic (58Â°C) anaerobic digestor: Methanothrix sp. as an important aceticlastic methanogen. *Applied and Environmental Microbiology,* **47,** 796-807.

Zumft, W.G. (1992) The Denitrifying Prokaryotes, pp. 554-582. Springer-Verlag.

Anexo 1: Diagramas do seqüenciamento da banda recortada do DGGE (Diagrama B) e da cultura purificada (Diagrama C).