Campus de São Carlos

**Avaliação da utilização de sulfeto e
cinética de crescimento de sulfobactérias
fototróficas verdes**

LUIS RICARDO ALMADO BARROS

Orientadora Prof^a Dr^a Maria Bernadete A. Varesche

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 01.10.03

Ass.: *Kamaghi*

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE SULFETO E CINÉTICA DE
CRESCIMENTO DE SULFUBACTÉRIAS FOTOTRÓFICAS VERDES**

Luis Ricardo Almado Barros

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

DEDALUS - Acervo - EESC

31100043580

Orientadora: Prof. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche

São Carlos

2003

Class.	TESE
Cut.	0654
Tombo	T201/03
Systno	1327026

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

B277a

Barros, Luis Ricardo Almado

Avaliação da utilização de sulfeto e cinética de crescimento de sulfobactérias fototróficas verdes / Luis Ricardo Almado Barros. -- São Carlos, 2003.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2003.

Área: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof^a. D^a. Maria Bernadete Amâncio Varesche.

1. Sulfeto. 2. Sulfobactérias fototróficas verdes.
3. Cinética de crescimento. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **LUÍS RICARDO ALMADO BARROS**

Dissertação defendida e julgada em 25-04-2003 perante a Comissão Julgadora:

Profª. Dra. **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE SILVA** (Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Prof. Dr. **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Profª. Dra. **BEATRIZ SUSANA OVRUSKI DE CEBALLOS**
(Universidade Federal da Paraíba/UFPB)

Profª. Associada **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Perfect Sense

(Roger Waters)

*The monkey sat on a pile of stones
And stared at the broken bone in his hand
And the strains of a Viennese quartet
Rang out across the land
The monkey looked up at the stars
And he thought to himself
Memory is a stranger
History is for fools
And he cleaned his hands
In a pool of holy writing
Turned his back on the garden
And set out for the nearest town
Hold on hold on soldier
When you add it all up
The tears and the marrowbone
There's an ounce of gold
And an ounce of pride in each sedge
And the Germans killed the Jews
And the Jews killed the Arabs
And the Arabs killed the hostages
And that is the news
And is it any wonder
That the monkey's confused
He said Mama Mama
The President's a fool
Why do I have to keep reading
These technical manuals
And the joint chiefs of staff
And the brokers on Wall Street said
Don't make us laugh
You're a smart kid
Time is linear
Memory is a stranger
History's for fools
Man is a tool in the hands
Of the great God Almighty
And they gave him command
Of a nuclear submarine
And sent him back in search
Of the Garden of Eden
Can't you see
It all makes perfect sense
Expressed in dollars and cents
Pounds shillings and pence
Can't you see
It all makes perfect sense
Little black soul departs in perfect focus
Prime time fodder for the News at Nine
Darling is the child warm in the bed tonight...*

Para
Carol e Helena

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria Bernadete Varesche pela amizade, paciência, orientação, exemplo de dedicação e enorme incentivo para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Marcelo Zaiat pela amizade, apoio e por sempre atender com enorme disposição às minhas dúvidas.

À Sávia Gavazza pela dedicação, apoio, paciência e principalmente pela amizade.

À Janja e à Beth pela amizade, convivência e ajuda em todos os momentos no laboratório e no dia-a-dia.

Ao Tininho pela amizade, apoio, incentivo e ajuda “cinética” no trabalho.

À Profa. Ruth pela paciência, amizade e apoio.

À Nelma, Ana Paula e à Leila pela amizade, ajuda e atenção prestadas.

À Profa. Maria de Carmo e à Dra. Valéria Del Nery pelas críticas e sugestões recebidas nos exames de qualificação.

À Sá, à Pavi e à Rose pela atenção e ajuda prestadas.

À Dona Terezinha pela amizade.

À Ana Paula Paim pela amizade e pela ajuda nos equipamentos de laboratório.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP pela dedicação e orientação que dispensam a seus alunos.

Aos grandes amigos do Laboratório de Processos Biológicos: Dick (Marquinho, pelas risadas no laboratório); Val (e Zé Antônio, pelos grandes favores); Fábio (pelo Inglês); Betão (pela companhia no café); Gica, Rogers e Samanta (pela enorme ajuda na cinética); Isabel (pela grande ajuda no laboratório e no trabalho); Du (pela ajuda com os adventos da informática); Ari (pelos artigos e dúvidas sobre as BRS); Gunther (pela ajuda na Biologia molecular); Karina (pelas discussões em Botânica); Flavinha; Júlia; Dirlane (pelas músicas cultas-osmóticas); Sérgio (pela sonoplastia Lálálálálá...); Douglas (pela excursão ao Beto Carrero World); Katt & Luis Hamilton; João; Mércia; Leonídia; Luana; Ana Paula; Arnaldo (parararaquara); Neyson; Andréa; Estela (pela ajuda no Inglês water = água); Charles (How are you?); Monique; Cubas & Cubas; Bruna (Mãe Diná, pelas deduções no mundo dos Biólogos); Tininha; André Coelho (pelos Cds do Backstreet Boys); André & Luciana; Fernandão e Eloísa.

Aos grandes amigos da Bio: Cássio, Hugo e Gustavo.

Ao Jorge Maia e à Márcia Maia pela amizade.

Aos meus pais por tudo, sempre...

À CAPES pela bolsa concedida.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Características Gerais das Bactérias Fototróficas Anoxigênicas.....	5
3.2 Fotossíntese Anoxigênica.....	8
3.3 Aparelho Fotossintético e Sistema de Membranas nas Bactérias Verdes.....	11
3.3.1 Bacterioclorofilas.....	11
3.3.2 Carotenóides.....	13
3.3.3 Sistemas de Membranas Fotossintéticas.....	14
3.4 Aspectos Ecológicos das Bactérias Fototróficas.....	14
3.5 Consórcios Microbianos.....	16
3.6 Biotecnologia Aplicada à Remoção de Sulfeto em Águas Residuárias.....	17
3.7 Cinética de Crescimento Microbiano.....	19
3.7.1 Interpretação dos Dados Cinéticos em Reatores em Batelada.....	20
3.7.2 Crescimento Microbiano em Reatores em Batelada.....	21
3.8 Técnicas em Biologia molecular.....	24
3.8.1 Caracterização da Diversidade Microbiana.....	24
3.8.2 Técnica da Reação de Polimerização em Cadeia.....	25
3.8.3 Técnica da Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante.....	27

4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Preparação da Coluna de Winogradsky.....	32
4.2 Meio de Cultura	33
4.3 Enriquecimento da Cultura	36
4.4 Ensaios em Reatores em Batelada	36
4.5 Exames Microbiológicos	37
4.6 Método para Determinação de Sulfeto Total	37
4.6.1 Solução de Acetato de Zinco	38
4.6.2 Solução de Dimetil- <i>p</i> -Fenilenodiamina.....	38
4.6.3 Solução de Sulfato Férrico Amoniacal.....	39
4.7 Método de Determinação de Enxofre	39
4.8 Método de Rompimento Celular	40
4.9 Método de Determinação de Proteína Total.....	41
4.9.1 Solução D	42
4.9.2 Solução de Folin Ciocalteau	42
4.9.3 Preparação da Curva de Calibração com Soro Albumina Bovina	42
4.10 Parâmetros de Avaliação da Cinética de Crescimento	43
4.11 Técnicas de Biologia molecular.....	44
4.11.1 Extração dos Ácidos Nucléicos	44
4.11.2 Amplificação do Gene através da Reação de Polimerização em Cadeia	45
4.11.3 Eletroforese em Gel de Agarose.	47
4.11.4 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Coluna de Winogradsky e Enriquecimento da Cultura	51
5.2 Avaliação da Utilização de Sulfeto por Sulfobactérias fototróficas verdes...54	
5.3 Cinética de Crescimento de Sulfobactérias fototróficas verdes.....	66
5.4 Caracterização Microbiana	77

6. CONCLUSÕES.....	80
7. RECOMENDAÇÕES.....	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Modelo hipotético da oxidação de sulfeto por bactérias fototróficas que armazenam enxofre elementar no interior das células (A) ou depositam o enxofre extracelularmente (B): (S_n^{2-}) polissulfetos, (iS^0) enxofre elementar intracelular, (eS^0) enxofre elementar extracelular.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2: Estrutura química da bacterioclorofila a.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3: Estrutura química da clorofila a.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4: Curva típica de crescimento de microrganismos em reatores em batelada.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 5 – Etapas experimentais em Biologia molecular para estudos da diversidade e organização de comunidades microbianas.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 6: Fluxograma do procedimento experimental dos ensaios com sulfobactérias fototróficas verdes.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 7: Coluna típica de Winogradsky.(INTERNET, 2002; Home page:http://people.clemson.edu/~skipper/Winogradsky/Slide1.GIF).....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 8: Aspecto visual das Colunas de Winogradsky</i>	<i>52</i>
<i>Figura 9: Aspecto morfológico de células semelhantes à Chlorobium e enxofre extracelular.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 10: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 11,4mg/L de sulfeto.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 11: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 40,5mg/L de sulfeto.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 12: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 147,2mg/L de sulfeto.....</i>	<i>57</i>

<i>Figura 13: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 262,4mg/L de sulfeto.</i>	58
<i>Figura 14: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 380,8mg/L de sulfeto.</i>	59
<i>Figura 15: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo em reatores em batelada alimentados com 529,6mg/L de sulfeto.</i>	60
<i>Figura 16: Variação da velocidade de consumo de sulfeto em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com diferentes concentrações de sulfeto</i>	62
<i>Figura 17: Variação da velocidade específica de crescimento de microrganismos em relação ao consumo de sulfeto.</i>	71
<i>Figura 18: Variação do tempo de geração (T_g) em relação às concentrações iniciais de sulfeto (mg-S/L).</i>	73
<i>Figura 19: Variação do coeficiente de conversão de sulfeto relativo ao crescimento de microrganismos, como função da concentração inicial de sulfeto nos reatores em batelada.</i>	75
<i>Figura 20: Efeito da velocidade de manutenção celular sobre o coeficiente de conversão substrato/microrganismo.</i>	76
<i>Figura 21: Visualização das bandas no gel de DGGE (com concentrações de 35 – 55% de gel desnaturante) das amostras dos reatores com diferentes concentrações iniciais de sulfeto e controles para comparação das bandas correspondentes às bactérias fototróficas.</i>	79

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Composição do meio de cultura para sulfobactérias verdes.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 2: Composição da solução traço para sulfobactéria verde.</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 3: Primers utilizados nos experimentos com PCR.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 4: Procedimento para o preparo da solução de PCR.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 5: Condições utilizadas na programação do aparelho para amplificação dos fragmentos de ácidos nucleicos por PCR.</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 6: Procedimentos para o preparo da solução do gel de gradiente desnaturante.</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 7: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 11,4mg/L de sulfeto.</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 8: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 40,5mg/L de sulfeto.</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 9: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 147,2mg/L de sulfeto.</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 10: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 262,4mg/L de sulfeto.</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 11: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 380,8mg/L de sulfeto.</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 12: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 529,6mg/L de sulfeto.</i>	<i>60</i>

<i>Tabela 13: Valores médios das concentrações inicial e final de sulfeto em função do tempo de consumo, durante o crescimento de sulfobactéria verde nos reatores em batelada.</i>	61
<i>Tabela 14: Valores médios de concentrações inicial e máxima de proteína total em função do tempo e das concentrações iniciais de sulfeto nos reatores em batelada.</i>	67
<i>Tabela 15: Valores médios de concentrações inicial e máxima de enxofre elementar em função do tempo e das concentrações iniciais de sulfeto nos reatores em batelada.</i>	68
<i>Tabela 16: Valores da velocidade específica de crescimento (μ) e do tempo de geração para as concentrações iniciais de sulfeto, durante o crescimento de sulfobactéria verde nos reatores em batelada.</i>	71
<i>Tabela 17: Valores dos coeficientes de conversão e das velocidades de crescimento em relação às diferentes concentrações iniciais de sulfeto nos reatores em batelada.</i>	75

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIÇÕES

ADP -	Adenosina difosfato
<i>All.</i> -	<i>Allochromatium vinosum</i>
ATP -	Adenosina trifosfato
<i>Bchl</i> -	Bacterioclorofila
C.E. -	Cultura enriquecida
dNTPs -	Desoxirribonucleosídeos trifosfatos
DGGE -	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
DMPD -	Dimetil- <i>p</i> -fenilenodiamina
DMSO -	Sulfóxido de dimetila
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
DNAr -	DNA ribossômico
H ₂ S -	Sulfeto de Hidrogênio
HS ⁻ -	Bissulfeto
<i>m</i> -	Velocidade específica de consumo de substrato para manutenção celular
NADPH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PBS -	Tampão Fosfato Salino
PCR -	Reação de polimerização em cadeia
Pi -	Fosfato inorgânico
<i>Pseud.</i> -	<i>Pseudomonas</i> sp
R1 -	Amostras de populações microbianas dos reatores com 11,4 mg-S/L
R2 -	Amostras de populações microbianas dos reatores com 40,5 mg-S/L
R3 -	Amostras de populações microbianas dos reatores com 147,2 mg-S/L

R4 -	Amostras de populações microbianas dos reatores com 262,4 mg-S/L
R5 -	Amostras de populações microbianas dos reatores com 380,8 mg-S/L
RNA -	Ácido ribonucleico
RNA _r -	RNA ribossômico
S ⁰ -	Enxofre elementar
S ⁻² -	Sulfeto
SAB -	Soro albumina bovina
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
SO ₃ ⁻² -	Sulfito
SO ₄ ⁻² -	Sulfato
TAE -	Tris-acetato
TDH -	Tempo de detenção hidráulica
TE -	Tris-EDTA
TESC -	Tris, EDTA, NaCl
Tg -	Tempo de geração
Y -	Coeficiente de conversão de substrato em biomassa
Y _g -	Parcela de substrato consumida e revertida para crescimento
Y _{p/s} -	Coeficiente de conversão de microrganismos em relação ao sulfeto consumido
μ -	Velocidade de crescimento da biomassa (t ⁻¹)

RESUMO

BARROS, L.R.A. (2003) Avaliação da Utilização de Sulfeto e Cinética de Crescimento de Sulfobactérias fototróficas verdes. São Carlos, 2003, 107p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A remoção de compostos sulfurosos (sulfeto/sulfato) de águas residuárias tem grande importância para a saúde humana e para o ambiente. A biorremediação desses compostos, através da utilização de bactérias fototróficas anoxigênicas apresenta-se como alternativa viável ecológica e economicamente. Neste projeto de pesquisa realizaram-se ensaios em reatores em batelada expostos à iluminação fluorescente, com a finalidade de avaliar a utilização de sulfeto por cultura enriquecida de sulfobactérias fototróficas verdes, proveniente de sedimento de lagoa de estabilização. A avaliação da utilização de sulfeto e os resultados da cinética de crescimento da cultura visam a possibilidade de aplicação das bactérias fototróficas anoxigênicas no tratamento de águas residuárias. Na avaliação cinética de crescimento da cultura enriquecida de sulfobactérias fototróficas verdes foi verificado diminuição na velocidade de crescimento de $0,0346 \text{ h}^{-1}$ para $0,0035 \text{ h}^{-1}$ com o aumento da concentração inicial de sulfeto de 11,4 para 529,6 mg-S/L, respectivamente. O tempo de geração apresentou comportamento crescente com valores iguais a 19,98 h e 119,18 h, respectivamente. Os valores do coeficiente de conversão de sulfeto relativo ao crescimento de microrganismos ($Y_{x/s}$), apresentaram diminuição progressiva com o aumento da concentração inicial de sulfeto, sendo esta queda mais acentuada no intervalo de concentrações de 40,5 a 147,2mg-S/L.

Palavras chave: sulfeto, sulfobactérias fototróficas verdes, enriquecimento, reatores em batelada, cinética de crescimento.

ABSTRACT

BARROS, L.R.A. (2003) Sulfide Utilization Evaluation and Growth Kinetics of the Green Sulphur Phototrophic Bacteria. São Carlos, 2003, 107p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The removal of sulphur compounds (sulfide/sulfate) from wastewaters is very important for human health and for the environment. The bioremediation of these compounds, applying anoxygenic phototrophic bacteria has been presented as a possible alternative. The aim of this work is to evaluate the utilization of sulfide by the enrichment of green sulphur bacteria proceeding from stabilization pond sediment, through the realization of batch reactors assays, which are exposed to fluorescent illumination. The determination of the sulfide utilization and the results of the kinetic growth were done to clarify the possibility of the application of anoxygenic phototrophic bacteria in the wastewater systems. In kinetic experiments it was observed that the specific rate of bacterial growth changed from 0.0346h^{-1} to 0.0035h^{-1} . Then the initial sulfide concentration was increased from 11.4mg-S/L to 529.6mg-S/L . The doubling time showed an increase from 19.98h to 119.18h . The sulfide conversion to microorganism biomass ($Y_{x/s}$) progressively decreased with the increase of sulfide concentration. Such a decrease was higher in between sulfide concentrations of 40.5mg-S/L to 147.2mg-S/L .

Keywords: sulfide, green sulphur phototrophic bacteria, enrichment, batch reactors, growth kinetics.

1. INTRODUÇÃO

O enxofre no ambiente natural encontra-se sob várias formas, como íon sulfato (SO_4^{2-}), íon sulfito (SO_3^{2-}), sulfeto (S^{2-} , HS^- ou H_2S), dióxido de enxofre (SO^2), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e enxofre molecular (S^0). Dentre as várias formas de enxofre presentes na água, o íon sulfato e o sulfeto são os mais frequentes (LENS *et al.*, 1998). O sulfeto, composto tóxico em determinadas concentrações e com cheiro desagradável, é encontrado em muitas águas residuárias, decorrente, principalmente, de atividades industriais (SÁNCHEZ *et al.*, 1996; HENSHAW & ZHU, 2001). O sulfeto insolúvel está geralmente associado a cátions de ferro, cobre, zinco ou níquel, e não exerce efeitos tóxicos para os microrganismos. No entanto, o sulfeto solúvel, dependendo da sua concentração, poderá inibir o crescimento e inviabilizar o processo metabólico de alguns organismos (SPEECE, 1996; HILTON & OLSZKIEWICZ, 1988).

A presença de determinada forma de sulfeto e sua toxicidade depende do pH do sistema. Em pH elevado, na faixa de 8 a 10, a forma predominante é o sulfeto (S^{2-}); em pH neutro, está presente como bissulfeto (HS^-); e em pH ácido na forma não dissociada ou livre, como sulfeto de hidrogênio (H_2S) (MADIGAN *et al.*, 1997). A demanda de oxigênio é de aproximadamente 2 mol O_2 /mol de sulfeto, sendo necessária, portanto, a sua remoção para evitar efeitos adversos no meio ambiente (KOBAYASHI *et al.*, 1982).

Os métodos comumente usados para a remoção de sulfeto são processos físico-químicos que envolvem a utilização de agentes oxidantes e exigências econômicas relativamente dispendiosas. Processo de tratamento biológico alternativo para a remoção desses compostos consiste na utilização de bactérias fototróficas anoxigênicas (SÁNCHEZ *et al.*, 1996; TAKASHIMA *et al.*, 2000). As bactérias fototróficas anoxigênicas são capazes de crescer em condições anaeróbias usando compostos reduzidos do enxofre, tais como sulfeto, tiosulfato e enxofre elementar na fotossíntese anaeróbia (CHARLTON *et al.*, 1997).

Processos biológicos de remoção de sulfeto oferecem as seguintes vantagens sobre o uso de técnicas físico-químicas: simplicidade, não necessita de aeração ou aditivos químicos e, portanto, é menos dispendioso. Além disso, as bactérias fototróficas são mantidas em sistemas anaeróbios, e a remoção de sulfeto pode ocorrer sem volatilização desse composto para a atmosfera e conseqüentemente, é livre de odor (VARESCHE, 1997; OPRIME, 2001). Por exemplo, a dessulfurização biológica utilizando sulfobactéria verde, *Chlorobium thiosulfatophilum* é vantajosa devido a alta capacidade de remoção de sulfeto, exigências nutricionais simples e condições operacionais que não requerem oxigênio. Adicionalmente, o sulfeto de hidrogênio poderá ser convertido em enxofre elementar e sulfato (PFENNIG & TRÜPER, 1989). CORK (1983) verificou que *C. thiosulfatophilum* oxidou aproximadamente 90% de sulfeto, presente em mistura de gases com 3,9mol de H₂S, a enxofre elementar, utilizando reator de mistura.

Nesta pesquisa avaliou-se a utilização de sulfeto e cinética de crescimento, a partir de cultura enriquecida de sulfobactérias fototróficas verdes. A avaliação da utilização de sulfeto foi realizada em ensaios em reatores em batelada, com diferentes concentrações desse composto. Para este estudo foram realizados enriquecimentos seletivos em coluna de Winogradsky, utilizando como fonte de inóculo sedimento de lagoa facultativa usada no tratamento de água residuária de abatedouro de frango.

A aplicação de técnicas de Biologia molecular para caracterização microbiana foi realizada através da técnica de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e pela Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).

Portanto, a realização de ensaios em reatores em batelada com sulfobactéria verde foi essencial para se conhecer adequadamente a capacidade de crescimento da cultura enriquecida; visando a sua possível aplicação para o tratamento de águas residuárias contendo sulfeto.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Enriquecer sulfobactérias fototróficas verdes e realizar ensaios em reatores em batelada com diferentes concentrações de sulfeto.

Objetivos específicos:

- Avaliar a utilização de sulfeto pela cultura enriquecida de sulfobactérias fototróficas verdes;
- Determinar os parâmetros cinéticos de crescimento nas diferentes concentrações de sulfeto;
- Caracterizar a cultura enriquecida através de técnicas tradicionais de microbiologia e de Biologia molecular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características Gerais das Bactérias Fototróficas Anoxigênicas

As bactérias fototróficas anoxigênicas são divididas em seis Famílias incluídas na Ordem *Rhodospirillales* e *Chlorobiales*. A primeira Ordem engloba todas as sulfobactérias púrpuras e as púrpuras não sulfurosas capazes de realizar metabolismo fotolitotrófico e fotoorganotrófico. A Ordem *Chlorobiales* abrange as bactérias verdes sulfurosas e não sulfurosas; e crescem em condições semelhantes às descritas anteriormente (PFENNIG & TRÜPER, 1989). Os termos bactérias verdes e purpúras são sinônimos de fototróficas ou fotossintetizantes (AMESZ & KNAFF, 1988). Essas bactérias realizam processo fotossintético denominado anoxigênico, diferentemente daquele realizado pelas cianobactérias, algas e plantas verdes (PFENNIG, 1978; OVERMANN & van GEMERDEN, 2000). A fotossíntese anoxigênica requer condições anaeróbias, devido ao fato da síntese dos pigmentos, bacterioclorofilas e carotenóides, ser fortemente reprimida pelo oxigênio (MADIGAN, 1988).

As bactérias pertencentes à Família *Chlorobiaceae* são, em geral, conhecidas como sulfobactérias verdes e possuem sistema pigmentar diferente das bactérias purpúras. Os compostos inorgânicos de enxofre são oxidados, e o dióxido de carbono é reduzido de modo análogo ao efetuado pelas sulfobactérias púrpuras. No entanto, as sulfobactérias verdes depositam o enxofre extracelularmente, enquanto as púrpuras o acumulam no interior das células (MADIGAN *et al.*, 1997). As bactérias da Família *Chlorobiaceae* não realizam a redução do sulfato e requerem compostos reduzidos de enxofre como fonte de enxofre. Podem assimilar alguns compostos orgânicos de carbono na presença de sulfeto e dióxido de carbono. Muitas espécies necessitam de vitamina B₁₂ para o crescimento (TRÜPER & PFENNIG, 1992).

As bactérias fototróficas representam grupo amplo e diverso metabolicamente, sendo encontradas em ambientes anaeróbios expostos à luz; como

por exemplo, lagoas de estabilização, reatores anaeróbios, sistemas aquáticos, lagos ricos em sulfeto e fontes hidrotermais (MADIGAN, 1988).

Em contraste com os outros organismos fototróficos, as sulfobactérias verdes toleram concentrações de sulfeto superiores a 500 mg/L e baixas intensidades luminosas (PFENNIG & TRÜPER, 1989; JEONG & KIM, 1999).

As variações na concentração da fonte de enxofre e na intensidade luminosa implicam em mudanças significativas nas relações competitivas entre os organismos fototróficos (van GEMERDEN, 1983). Usualmente, em muitos lagos, sulfobactérias verdes e púrpuras coexistem em camadas d' água, lama e sedimentos, mesmo se a cor da amostra sugerir a presença de apenas um grupo (TRÜPER & PFENNIG, 1992).

Na oxidação do sulfeto, pelas bactérias verdes, enxofre elementar (S^0) hidrofílico aparece na forma de glóbulos fora da célula (TRÜPER & PFENNIG, 1992). Esses glóbulos atingem diâmetros de 1 μ m. Na temperatura de 20°C, as formas de valência zero do enxofre, são sólidas e usualmente cristalinas. A natureza química exata dos glóbulos de enxofre ainda não está totalmente clara; apesar dos estudos sobre a sua natureza química serem realizados há mais de séculos (PRANGE *et al.*, 1999).

O enxofre elementar não é corrosivo, sendo de fácil manipulação e transporte. Em adição, tem amplo valor comercial. Processos físico-químicos envolvidos na produção de enxofre elementar requerem grandes gastos energéticos e econômicos. Em contraste, métodos biológicos apresentam vantagens para a produção de enxofre elementar, mesmo quando a concentração de sulfeto é baixa (HENSHAW & ZHU, 2001).

A coexistência entre bactérias fototróficas que armazenam enxofre intracelularmente (bactérias púrpuras) e as que depositam extracelularmente (bactérias verdes) sugere papel importante na natureza, relacionado com a distribuição desses microrganismos nos diferentes ambientes (van GEMERDEN & BEEFTINK, 1981).

van GEMERDEN (1984) realizou pesquisas dirigidas em correlacionar a afinidade pelo sulfeto e a produção de enxofre. Foi demonstrado, nas bactérias que

armazenam enxofre extracelular alta afinidade pelo sulfeto, quando comparadas com as que armazenam intracelularmente. Demonstrou-se ainda, que as bactérias verdes cresceram vigorosamente em menores concentrações de sulfeto, quando comparadas com as púrpuras. Ainda, a inibição por sulfeto é maior nas bactérias que acumulam enxofre intracelular.

Neste contexto, van GEMERDEN (1984), ¹apud VARESCHE (1997) estabeleceu várias hipóteses para tentar explicar a afinidade pelo sulfeto exibida pelas bactérias fototróficas em relação ao depósito de enxofre elementar. Deste modo, as seguintes hipóteses podem ser consideradas:

- (i) nas bactérias que mostraram alta afinidade pelo sulfeto, o acceptor primário de elétrons para a oxidação a enxofre, estaria localizado exteriormente à membrana celular. Assim, o sulfeto (S^{2-} , HS^- ou H_2S) não atravessaria a membrana e o enxofre produzido seria depositado externamente;
- (ii) nas bactérias que exibiram menor afinidade pelo sulfeto, o acceptor primário estaria localizado no interior da membrana celular. Conseqüentemente, o sulfeto teria que atravessar a membrana anteriormente a sua oxidação, e o enxofre formado estaria no interior da célula;
- (iii) como em outras bactérias, a membrana celular interna teria carga negativa e a externa positiva. Então, o transporte ativo seria necessário para deslocar bissulfeto (HS^-) ou sulfeto (S^{2-}) pela membrana. O sulfeto de hidrogênio (H_2S) seria transportado através da difusão passiva. Esses mecanismos seriam passos limitantes na oxidação do sulfeto, resultando em atividade reduzida desses microrganismos quando comparados com os que oxidam o sulfeto externamente à membrana;
- (iv) a mais severa inibição por sulfeto, observada nos microrganismos que armazenam o enxofre intracelularmente, poderia ser explicada pela ocorrência de sulfeto tóxico no interior da célula.

¹ van GEMERDEN, H. The Sulfide Affinity of Phototrophic Bacteria in Relation to the Location of Elemental Sulfur. *Archives of Microbiology*, 139: 289-294, 1984

De acordo com o autor não há exemplos conhecidos que contradizem a afirmação que a afinidade por sulfeto e o local do depósito de enxofre são fenômenos relacionados. A Figura 1 apresenta modelo hipotético de oxidação de sulfeto pelas bactérias fototróficas.

3.2 Fotossíntese Anoxigênica

Como mencionado anteriormente, na fotossíntese anoxigênica não há produção de oxigênio e ao invés da água, as bactérias fototróficas utilizam compostos reduzidos de enxofre como doadores de elétrons para a redução do dióxido de carbono (TRÜPER, 1978; MADIGAN, 1988). Em outras palavras, as bactérias verdes são obrigatoriamente fotoautotróficas no sentido em que a fixação do dióxido de carbono é requerida para o seu crescimento (SOJKA, 1978).

Durante o crescimento autotrófico, essas bactérias oxidam o doador de elétrons externo e reduzem a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP^+). Nesse metabolismo ocorre a oxidação do sulfeto com produção de sulfato. Por outro lado, no crescimento fotoheterotrófico, o succinato, por exemplo, poderá ser usado como doador de elétrons, com formação final de fumarato (MADIGAN, 1988).

Estudos sobre o metabolismo de *Chlorobium thiosulfatophilum* (JEONG & KIM, 1999), demonstraram que a fotossíntese, utilizando sulfeto como doador de elétrons, ocorreu em dois estágios: (1) as reações de claro, havendo a necessidade de fonte luminosa, e (2) as reações de escuro, que não necessitam da presença de luz. Nas reações de claro, as bacterioclorofilas absorveram a energia luminosa, conservando-a em produtos químicos de alta energia, adenosina trifosfato (ATP) e nicotinamida-adenina-difosfato (NADPH); simultaneamente, enxofre elementar foi produzido extracelularmente (Eq. 1). Nas reações de escuro, ATP e NADPH, produzidos nas reações de claro, foram utilizados na redução do dióxido de carbono, processo denominado ciclo do ácido tricarboxílico, que envolve reações de transferências de elétrons para formar glicose e outros produtos orgânicos (Eq. 2).

Figura 1: Modelo hipotético da oxidação de sulfeto por bactérias fototróficas que armazenam enxofre elementar no interior das células (A) ou depositam o enxofre extracelularmente (B): (S_n^{2-}) polissulfetos, (iS^0) enxofre elementar intracelular, (eS^0) enxofre elementar extracelular.

Fonte: van GEMERDEN (1984), ²apud VARESCHE, 1997

² van GEMERDEN, H. The Sulfide Affinity of Phototrophic Bacteria in Relation to the Location of Elemental Sulfur. *Archives of Microbiology*, 139: 289-294, 1984.

Portanto, a formação de enxofre elementar na presença de luz, e a redução do dióxido de carbono, sem a necessidade da luz, são processos separados.

No fotometabolismo das bactérias verdes, o sulfeto também proporciona baixo potencial de oxirredução, necessário para o crescimento em condições anaeróbias estritas. Muitas espécies utilizam, ainda, hidrogênio e tiosulfato como doadores de elétrons para a fotossíntese (OVERMANN & van GEMERDEN, 2000).

Chlorobium tepium, em contraste com outros organismos da Família *Chlorobiaceae*, quando utiliza tiosulfato como doador de elétrons, cresce rapidamente e atinge elevada densidade celular; enquanto que na utilização de sulfeto como fonte de elétrons, o crescimento tem menor rendimento. No entanto, MUKHOPADHYAY *et al.* (1999) demonstraram que *Chlorobium tepium* pode crescer com sulfeto como principal fonte de elétrons, com taxas e rendimento (densidade) celular, comparáveis aos encontrados quando se utiliza tiosulfato como fonte de elétrons. Segundo os autores, a concentração ótima de tiosulfato, nas condições de estudo, foi de 12mM, que correspondeu à velocidade máxima de crescimento específico e maior densidade celular, iguais a $0,22\text{h}^{-1}$ e 376mg de proteína celular por litro de cultura, respectivamente. No referido estudo, os autores demonstraram, também, que quando *Chlorobium tepium* foi mantida em cultura contendo apenas sulfeto como doador de elétrons, em concentração menor que 0,1mM e potencial redox de $-300 \pm 20\text{mV}$, houve crescimento com taxa e rendimento celular similares aos encontrados quando tiosulfato foi utilizado. Esses estudos foram realizados utilizando fotorreator iluminado com lâmpadas incandescentes de 60 Watts.

Para a maioria das bactérias da Família *Chlorobiaceae*, não há crescimento na ausência de compostos reduzidos de enxofre. HOARE & GIBSON (1964) demonstraram que *Chlorobium limicola* e *Chlorobium thiosulphatophilum* cresceram

na presença de pequenas concentrações de compostos orgânicos simples. O acetato, em concentração de 5mM, foi o composto orgânico mais efetivo na promoção do crescimento celular. A assimilação do acetato ocorreu apenas quando bicarbonato e sulfeto estiveram presentes. O requerimento de sulfeto para a assimilação de acetato sugeriu que *C. limicola* teve habilidade limitada em oxidar o acetato. A capacidade de fotoassimilar substratos orgânicos simples ou usá-los como doadores de elétrons para a redução do dióxido de carbono, mostrou que diferentemente das bactérias purpúras, a Família *Chlorobiaceae* tem metabolismo intermediário do carbono puramente anabólico (PFENNIG, 1978).

3.3 Aparelho Fotossintético e Sistema de Membranas nas Bactérias Verdes

Em relação à utilização da energia luminosa, no metabolismo fotossintético das bactérias verdes a luz é absorvida através de organelas especiais denominadas clorossomos. Estes contêm o complexo antena de bacterioclorofilas (bchl) e transferem a energia para a bacterioclorofila do centro de reação na membrana plasmática. A bacterioclorofila do centro de reação é sempre a bchl *a* para a Família *Chlorobiaceae* (TRÜPER & PFENNIG, 1992; HOLT *et al.*, 1994; STEENSGAARD *et al.* 2000).

3.3.1 Bacterioclorofilas

Todas as bactérias fototróficas contêm bacterioclorofilas, pigmento fotossensível, envolvido nas reações fotoquímicas que convertem energia luminosa em adenosina trifosfato -ATP (MADIGAN, 1988). O espectro de absorção das bactérias verdes encontra-se na faixa de 460 a 750nm, e está relacionado com os clorossomos que contêm as bacterioclorofilas *c*, *d* e *e*. Todas possuem pequenas quantidades de bacterioclorofila *a*, localizada na membrana citoplasmática (MADIGAN *et al.*, 1997). As bacterioclorofilas absorvem luz numa região próxima ao infravermelho (660 a 870 nm) (AMESZ & KNAFF, 1988).

As Figuras 2 e 3 mostram, respectivamente, as estruturas químicas da bacterioclorofila α e da clorofila a (pigmento fotossensível encontrado nas cianobactérias, algas e vegetais superiores).

Importante diferença entre as sulfobactérias verdes e púrpuras consiste nos pigmentos de bacterioclorofilas. Apesar das triviais denominações “verdes” e “púrpuras”, estas não são, usualmente, as cores de colônias e células em suspensão; que podem ser verdes e marrons para as sulfobactérias verdes, e laranja, púrpura, vermelha e verde para as sulfobactérias púrpuras. Dessa forma, o espectro de absorção das bacterioclorofilas, constitui importante mecanismo de diferenciação entre sulfobactérias verdes e púrpuras (TRÜPER & PFENNIG, 1992).

Figura 2: Estrutura química da bacterioclorofila α .

Fonte: (Internet: <http://www.wasburn.edu/cas/chemistry/slenng/porphyrin/bacteriochlorophyll.gif>)

Figura 3: Estrutura química da clorofila *a*.

Fonte: (Internet: <http://www.wasburn.edu/cas/chemistry/slenng/porphyrin/chlorophyll.gif>)

3.3.2 Carotenóides

Os carotenóides não agem diretamente nas reações de fotofosforilação. Através de estudos com culturas puras de bactérias verdes e púrpuras verificou-se que os carotenóides não servem apenas como proteção à fotooxidação, mas também funcionam como pigmento fotossintético acessório, captando ondas de luz não absorvidas pelas bacterioclorofilas e transferindo energia a esses pigmentos (MADIGAN *et al.*, 1997).

Cinco principais classes de carotenóides são conhecidas nas bactérias fototróficas, e, com poucas exceções, os carotenóides encontrados nas bactérias púrpuras não são encontrados nas bactérias verdes, e vice-versa (MADIGAN, 1988).

A coloração característica dos florescimentos de púrpuras não é usualmente púrpura, mas marrom, cor de rosa, vermelho amarronzada, violeta-púrpura ou marrom alaranjada; bem como das verdes, que pode ser além de verde, marrom ou

laranja, devido à presença dos carotenóides. Assim, a cor não é um bom critério para usar na identificação de bactérias verdes ou púrpuras (LIAAEN-JENSEN, 1978).

3.3.3 Sistemas de Membranas Fotossintéticas

Nos procariotos, os pigmentos fotossintéticos estão integrados em um complexo sistema interno de membranas (MADIGAN, 1988). As bacterioclorofilas e os carotenóides das bactérias fototróficas estão localizados em membranas intracitoplasmáticas distintas morfologicamente SPRAGUE & VARGA (1989)³ apud VARESCHE (1997).

Nas bactérias verdes, o aparelho fotossintético é morfologicamente diferente; a *bcl α* e os componentes da cadeia fotossintética de transporte de elétrons, estão localizados na membrana citoplasmática, que ao contrário das bactérias púrpuras, não se encontra diferenciada no interior da célula. A maioria das bacterioclorofilas (*c*, *d* ou *e*) dependendo da espécie, está presente no interior de estruturas cilíndricas, denominadas clorossomos ou vesículas de *Chlorobium*, ligadas à membrana citoplasmática através da região basal (MADIGAN, 1988).

STOLZ *et al.* (1990) analisaram a diversidade protéica dos clorossomos de bactérias verdes, sugerindo divergência evolutiva, em função dos diferentes pigmentos encontrados nas espécies de bactérias verdes.

FUHRMANN *et al.* (1993) verificaram que a vitamina B₁₂ e a intensidade luminosa influenciaram na formação dos clorossomos de *Chlorobium limicola*.

3.4 Aspectos Ecológicos das Bactérias Fototróficas

Em lagos, as bactérias fototróficas sulfurosas podem ser encontradas sobre as plantas em decomposição, formando finas películas, cuja cor varia de rosa-claro,

³ SPRAGUE, S.G. & VARGA, A.R. Topography, composition and Assembly of Photosynthetic Membranes, In: *PhotosynthesisIII: Photosynthetic Membranes and Light Harvesting Systems*. Edited by L.A. Stalhelin and C.J. Arntzen. Volume 19, 1989.

vermelho ou verde. No entanto, a ocorrência principal destas bactérias é abaixo do metalímnio, quando ocorrem condições favoráveis para o seu desenvolvimento, como a presença de luz, sulfeto, dióxido de carbono e ácidos orgânicos.

Nesta profundidade, em geral, toda a faixa vermelha do espectro solar é absorvida por estes organismos. Todas estas condições podem ser encontradas em lagos eutróficos e, especialmente, em lagos meromíticos. Nestes lagos pode ocorrer intenso desenvolvimento na região microaerófila, com sulfeto e luz disponíveis (ESTEVES, 1998).

Dessa forma, a faixa limite de crescimento das sulfobactérias fototróficas verdes deve coincidir com o sulfeto disponível, que não deve ser limitado no metabolismo fotossintético. Essas exigências demonstram as características nutricionais desses microrganismos anaeróbios estritos. Em contraste, as bactérias púrpuras sulfurosas, que são menos exigentes em relação à anaerobiose e usam substâncias orgânicas para o crescimento, ajustam-se em relação à concentração de sulfeto, ou seja, movem-se na coluna d'água em função da disponibilidade dessa fonte de enxofre (MADIGAN, 1988).

O ciclo do enxofre apresenta fases de oxidação e redução, que em um ecossistema natural devem equilibrar-se. Na fase de redução, sulfato e enxofre funcionam como aceptores de elétrons no metabolismo das bactérias redutoras de sulfato (BRS). Na fase de oxidação, compostos reduzidos de enxofre servem como doadores de elétrons para a fotossíntese bacteriana (JANSSEN *et al.* 1999). Nesse sentido, as sulfobactérias autotróficas são de extrema importância ao ciclo biológico, atuando na oxidação biológica de compostos de enxofre (TAKASHIMA *et al.* 2000).

Uma característica ecológica significativa da Família *Chlorobiaceae* é a habilidade de crescer particularmente em comunidades sintróficas com bactérias anaeróbias. Exemplo desse sintrofismo são as interações ecológicas entre as bactérias fototróficas e redutoras do sulfato, importantes na ciclagem de compostos de enxofre. Esses consórcios são excelentes modelos para a evolução dessas interações em ambientes distintos (OVERMANN & van GEMERDEN, 2000).

3.5 Consórcios Microbianos

Em condições anaeróbias, os processos de redução e oxidação dos compostos de enxofre são, exclusivamente, mediados por microrganismos (PFENNIG & WIDDEL, 1982). As transformações desses compostos de enxofre, relacionadas aos processos metabólicos dos microrganismos podem causar mudanças significativas nos ambientes através da produção de metabólitos tóxicos (BAULD, 1986).

Os processos de oxidação desassimilativa estão freqüentemente relacionados com a fixação do CO₂, realizados por microrganismos quimioautotróficos e fotoautotróficos. Enquanto que a redução desassimilativa está associada à decomposição do carbono orgânico (PFENNIG, 1978).

O sulfeto, proveniente da redução do sulfato, pode ser oxidado sob condições anaeróbias por bactérias fototróficas e algumas cianobactérias capazes de realizar a fotossíntese anoxigênica. O produto final dessa oxidação anaeróbia é, geralmente, sulfato. No entanto, enxofre elementar é um intermediário dessa oxidação, que pode ser utilizado como fonte adicional de enxofre (TRÜPER, 1978).

A busca da interação das características metabólicas de comunidades microbianas, representando uma relação sintrófica, pode significar maior conhecimento das transformações microbianas em ambientes naturais (BAULD, 1986; OVERMAN & van GEMERDEN, 2000).

BIEBL & PFENNIG (1978) demonstraram que na presença de acetato, *Desulfuromonas sp.* cresceram vigorosamente em condições sintróficas, com culturas de sulfobactérias fototróficas verdes. Para essas duas bactérias, o crescimento em cultura mista forneceu condições ótimas no uso mútuo dos produtos metabólicos. Nessa co-cultura, não ocorreu o aparecimento de enxofre elementar, já que a oxidação do sulfeto realizada pelas sulfobactérias fototróficas verdes, resultava em uma forma dissolvida de enxofre, que era imediatamente reduzido a sulfeto pelas *Desulfuromonas*.

No mesmo estudo, foi demonstrado, também, crescimento sintrófico de *Chlorobium limicola* com *Desulfovibrio desulfuricans*, utilizando-se etanol como fonte de carbono para essa última.

Em co-cultura, as interações metabólicas sugerem que a atividade das sulfobactérias fototróficas verdes é controlada pela atividade das bactérias redutoras de sulfato, no sentido em que essas bactérias realizam processo de redução do íon sulfato à sulfeto. No entanto, em alguns ecossistemas aquáticos, onde o *pool* de compostos inorgânicos de enxofre é relativamente baixo, as bactérias redutoras de sulfato freqüentemente contam com a atividade das bactérias fototróficas para a disponibilidade de aceptores de elétrons (OVERMANN & van GEMERDEN, 2000).

Dessa forma, nesse ciclo de átomos de enxofre, as interações metabólicas das bactérias fototróficas e das redutoras de sulfato possibilitam a aplicação biotecnológica, na busca da remoção de compostos sulfurosos em águas residuárias, juntamente com controle operacional para produção de enxofre elementar.

3.6 Biotecnologia Aplicada à Remoção de Sulfeto em Águas Residuárias

O sulfeto de hidrogênio é liberado no ambiente, principalmente, por indústrias petroquímicas, de curtume e águas residuárias provenientes de indústrias de papel e celulose (JANSSEN *et al.* 1999). Grande preocupação em relação ao sulfeto é devido a sua toxicidade à vida aquática, mesmo em baixas concentrações – de aproximadamente 0,5 ppm -. Dessa forma, a remoção de sulfeto em águas residuárias é requerida por razões de saúde, problemas de odores, segurança e corrosão (HENSHAW & ZHU, 2001).

Na busca de alternativas para a remoção de sulfetos em águas residuárias, muitos processos físico-químicos são amplamente aplicados. Como mencionado anteriormente, a alta demanda energética e elevado custo de produtos químicos constituem importantes inconvenientes à aplicação desses métodos (JANSSEN *et al.* 1999).

A remoção biológica de sulfeto através da oxidação a enxofre elementar para tratamento de águas residuárias é estudada como processo alternativo aos convencionais métodos mencionados acima. O processo biológico, direcionado a alta eficiência na remoção de sulfeto, é essencial à aplicação da biotecnologia, no sentido do conhecimento do metabolismo microbiano associado à construção dos

fotorreatores. Esses processos são relativamente econômicos, podem proceder à temperatura ambiente e pressão atmosférica (JANSSEN *et al.* 1999; JEONG & KIM, 1999).

Exemplos de processos biotecnológicos relacionados à remoção de sulfeto consistem na utilização de sulfobactérias verdes (Família *Chlorobiaceae*) e púrpuras (Família *Chromatiaceae*) que catalisam, sob condições anaeróbias, a reação fotossintética (Eq. 3):

Dessa forma, o ciclo biológico do enxofre oferece oportunidades substanciais para o tratamento de águas residuárias, na aplicação de tecnologia ambiental e processos industriais. Com a combinação de processos anaeróbios de redução de sulfato e oxidação de sulfeto, muitos compostos inorgânicos de enxofre podem ser convertidos a enxofre elementar (JANSSEN *et al.* 1999).

KIM *et al.* (1992) desenvolveram trabalho de conversão de sulfeto de hidrogênio a enxofre elementar ou sulfato, através da bactéria fotossintética *Chlorobium thiosulfatophilum*, utilizando reatores em batelada de 2 e 4 Litros, iluminados com duas lâmpadas incandescentes.

Os autores demonstraram que ocorreu inibição para concentrações de sulfeto acima de 5,4mM (172,8mg/L). A intensidade luminosa, considerada como parâmetro fundamental para crescimento celular, apresentou-se como fator limitante no estudo, ou seja, para intensidades médias de 40.000lux houve inibição pelo sulfeto em concentrações de 5,0mM (160,0mg/L).

KOBAYASHI *et al.* ⁴(1983) apud VARESCHE (1997) desenvolveram dois reatores para tratar sulfetos com bactérias fototróficas. O primeiro sistema consistiu de uma coluna fotossintética preenchida com material suporte (anéis de “rasching”) enquanto o segundo correspondeu a um fototubo, submerso em banho-maria

⁴ KOBAYASHI, H.A., STENSTROM, M. & MAH, R. A. Use of Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Sulfide Removal from Anaerobic Waste Treatment Effluent. *Water Research*, 17: 579-587, 1983.

contendo agente redutor (sulfito de sódio) e catalisador (cloreto de cobalto) para possibilitar condições anaeróbias. Os reatores foram iluminados com lâmpadas incandescentes de 40 Watts, atingindo intensidade luminosa de aproximadamente 1600 a 3730 lux, respectivamente. Os reatores foram inoculados com bactérias fototróficas obtidas de cultura enriquecida. A água residuária utilizada no tratamento foi efluente de filtro anaeróbio alimentado com água-pé triturado em liquidificador de uso doméstico.

Segundo os autores, o fototubo apresentou melhor desempenho na remoção de sulfetos. A coluna necessitou de 18 horas para atingir a eficiência de 95% com carga de 0,019 gS⁻²/L.dia. O tubo foi capaz de obter a mesma eficiência em 24,6 minutos com 1,6 gS⁻²/L.dia. O melhor desempenho do fototubo foi atribuído a iluminação mais adequada, diminuindo o efeito do sombreamento, e talvez o melhor contato entre os microrganismos e o sulfeto.

Os microrganismos predominantes na coluna e tubo fotossintético foram identificados como *Chlorobium limicola* e *Rhodopseudomonas* sp.

HENSAHW & ZHU (2001), utilizaram sulfobactéria verde *Chlorobium thiosulfatophilum* para remoção de sulfeto de água residuária industrial, e conversão a enxofre elementar. Ampla produção de enxofre elementar foi adquirida com a utilização de biorreator fotossintético de leito fixo. A alta eficiência operacional do reator foi relacionada com o metabolismo microbiano, associado à retenção celular e intensidade luminosa.

Nesse estudo, para cargas de sulfeto de 111 a 286mg/h.L, 100% do sulfeto afluente foi removido, e 92-95% desse sulfeto foi convertido a enxofre elementar. A carga máxima sustentável de sulfeto foi de 286mg/h.L. O tempo de detenção hidráulica foi de 0,5h, com volume total de reação de 21,2mL.

3.7 Cinética de Crescimento Microbiano

O estudo da velocidade de crescimento dos microrganismos, do consumo de substrato e formação de produto, é parte integrante da cinética bioquímica. A

velocidade de crescimento dos microrganismos, por exemplo, pode ser expressa por modelos matemáticos que representem adequadamente a dinâmica desse processo.

Em relação às aplicações da cinética bioquímica, os parâmetros cinéticos podem fornecer informações importantes sobre o crescimento e utilização do substrato por determinada biomassa. Nesse sentido, dois aspectos importantes formam a base dos modelos cinéticos biológicos: a) a concentração de substrato; e b) a concentração de biomassa (CHERNICHARO, 1997; FORESTI *et al.*, 1999).

Dessa forma, a cinética de populações microbianas é normalmente influenciada por fatores como a interação entre a biomassa e a composição do meio, por exemplo, com as características do substrato.

3.7.1 Interpretação dos Dados Cinéticos em Reatores em Batelada

Os resultados das análises experimentais de reatores em batelada podem fornecer dados aplicáveis à equações de cinética de velocidade de crescimento dos microrganismos.

Os reatores em batelada geralmente são operados à temperatura e volume constantes. Esses reatores são relativamente simples, adaptáveis facilmente à escala de laboratório; assim, eles são usados sempre que possível para obter dados de cinética homogênea.

Em relação aos dados cinéticos, o método integral é um procedimento geralmente utilizado para análise dos mesmos. No método integral de análise, supõe-se uma forma particular de equação de velocidade e, depois de integração apropriada e manipulação matemática, deve-se obter uma linha reta em gráfico que expresse determinada concentração *versus* tempo. Os dados são colocados, então, em forma gráfica e se uma reta for razoavelmente obtida, então a velocidade de reação ajusta os dados de forma aceitável (LEVENSPIEL, 1999).

3.7.2 Crescimento Microbiano em Reatores em Batelada

A diversidade de nichos ecológicos ocupados pelos microrganismos confere, a estes, variados modelos de crescimento. O crescimento bacteriano (ou celular) em laboratório relaciona-se diretamente com seu respectivo nicho ecológico; ao mesmo tempo a presença de condições adequadas de crescimento, como meio de cultura e a disponibilidade apropriada dos fatores abióticos, favorece o crescimento e, dessa forma, o estudo desses microrganismos (COOPER, 1991).

Em laboratório, durante certos intervalos com culturas mantidas em reatores em batelada, a população celular cresce em estado transiente, onde diferentes modelos cinéticos de crescimento são requeridos para descrever essa situação.

Nos processos comuns de batelada, o número de células (microrganismos) varia com o tempo, como mostrado na Figura 4. Depois da *fase lag*, onde não há crescimento evidente no número de células, segue período de rápido crescimento, durante o qual, o número de células cresce exponencialmente com o tempo. Apesar deste estágio nas culturas em batelada, ser freqüentemente denominado *fase logarítmica*, o termo *fase exponencial* pode ser também aplicado. Naturalmente, em reatores em batelada as células não podem multiplicar indefinidamente, então, uma *fase estacionária*, segue-se ao período de crescimento exponencial. Eventualmente, declínio no número de células ocorre durante a *fase de morte*. Nesse ponto, decaimento exponencial no número de células é freqüentemente observado (BAYLE & OLLIS, 1986; COOPER, 1991; VARESCHE, 1997).

Ao final da *fase lag* a população de microrganismos estará adaptada ao meio; dessa forma as células podem se multiplicar rapidamente, e a biomassa, ou o número de células, se duplica regularmente com o tempo. A equação 4 representa o aumento do número de células durante o período de crescimento exponencial da biomassa (BAYLE & OLLIS, 1986; CHERNICHARO, 1997).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4)$$

onde:

dX/dt = variação da concentração de microrganismos (mg/L) em função da variação de tempo (h)

μ = velocidade de crescimento específico da biomassa (h^{-1})

Figura 4: Curva típica de crescimento de microrganismos em reatores em batelada.

Fonte: COOPER (1991)

O tempo necessário para que a população se duplique, é definido como tempo de geração (T_g). A partir da dedução (integração) da Equação 4, dentro dos limites definidos, conduz a:

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (5)$$

E dessa forma, a determinação de μ permite o cálculo do tempo de geração da cultura, através da Equação 5 (BAYLE & OLLIS, 1986; VARESCHE, 1997).

O coeficiente de produção de biomassa, isto é, a relação entre concentração de substrato e a velocidade de crescimento microbiano, é um parâmetro importante (SPEECE, 1996; CHERNICHARO, 1997). Em reatores em batelada, por exemplo, a velocidade de utilização de substrato expressa a capacidade de conversão de substrato em biomassa (atividade específica da biomassa), por unidade de tempo, e é representada através da seguinte relação (Eq. 6):

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

onde:

dS/dt = velocidade de utilização de substrato (mg/L.h)

Y = coeficiente de conversão de substrato em biomassa (mg/mg.h)

Embora o fator de conversão $Y_{x/s}$ seja, na maioria das situações, uma constante, PIRT (1965)⁵ (1965) apud VARESCHE (1997) apresentou um modelo que considera o consumo de substrato para a manutenção das células (Eq. 7).

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y_g} + \frac{m}{\mu} \quad (7)$$

Em que Y_g representa a parcela de substrato consumida que é revertida apenas para crescimento, e m é a velocidade específica de consumo de substrato para manutenção celular.

Se a velocidade específica de crescimento de microrganismos for muito maior que a velocidade específica de consumo de substrato para a manutenção, ou se m for desprezível, o fator de conversão substrato em microrganismos será igual à Y_g .

⁵ PIRT, S.J. The Maintenance Energy of Bactéria in Growing Cultures. Proc. Royal Soc. – B, 163: 224-231, 1965

3.8 Técnicas em Biologia molecular

3.8.1 Caracterização da Diversidade Microbiana

A identificação e a quantificação de organismos são procedimentos e parâmetros importantes no estudo sobre diversidade biológica. No entanto, tais aspectos constituem tarefas difíceis no estudo da ecologia microbiana. Estudos e dados sobre a atividade metabólica de microrganismos, ou sobre interações ecológicas entre os mesmos, em ambientes naturais, são informações importantes. Contudo, estas nem sempre fornecem subsídios sobre as espécies envolvidas no processo. Ainda, muitos microrganismos estão aderidos à partículas de sedimentos e de solos, dificultando a observação microscópica e o estudo destes. Dessa forma, o conhecimento taxonômico e filogenético das comunidades microbianas, assim como os fatores que controlam a quantidade e a distribuição dessas comunidades são relativamente limitados (MUYSER *et al.*, 1993; CASAMAYOR, 2000).

Muitas comunidades microbianas, em ambientes naturais, são extremamente diversificadas. Estimativas em estudos sobre diversidade genética mostram que, em solos, por exemplo, a comunidade microbiana pode consistir de mais de 4000 diferentes genomas. Em sedimentos marinhos, o número de genomas diferentes pode exceder 10000.

Ainda, diante dessa enorme diversidade, apenas pequena fração da comunidade microbiana pode ser investigada por métodos e técnicas tradicionais. Por exemplo, pequena porcentagem dos microrganismos encontrados em ambientes naturais pode ser cultivada em laboratório (JASPERS & OVERMANN, 1997).

No sentido de buscar o estudo e a identificação da enorme diversidade das comunidades microbianas, métodos em biologia molecular têm sido introduzidos nas pesquisas sobre ecologia microbiana (HEUER *et al.* 1997; ROSADO *et al.*, 1997). As técnicas em biologia molecular oferecem novas oportunidades para análises da estrutura e da composição das comunidades microbianas (SAKAMOTO, 2001).

Estas técnicas, além de contribuírem para a identificação dos microrganismos, têm confirmado e revelado a enorme diversidade dos mesmos. Estes estudos têm, ainda, possibilitado entender as relações entre os processos microbianos com os

próprios microrganismos envolvidos (CASAMAYOR, 2000; AMANN & LUDWIG, 2000).

Neste estudo, para a caracterização da diversidade microbiana foram realizados os seguintes passos: a extração do DNA da amostra; seguida pela amplificação dos segmentos de DNA por Reação de Polimerização em Cadeia (PCR); e finalmente, a amostra foi submetida à eletroforese em gel, com gradiente desnaturante (DGGE), para detectar alterações nos produtos de PCR (CATTONY, 2001).

A Figura 5 apresenta um exemplo esquemático das etapas descritas previamente.

3.8.2 Técnica da Reação de Polimerização em Cadeia

As aplicações dos métodos de Biologia molecular, freqüentemente, têm sido norteadas no sentido da realização de estudos filogenéticos a partir da clonagem e análises comparativas de genes presentes nas longas fitas de RNAr (RNA ribossômico). Mais especificamente, na sub-unidade 16S do ribossomo bacteriano. O RNAr 16S é uma molécula ancestral, que possui regiões altamente conservadas (durante a evolução biológica), por extensas distâncias filogenéticas (MADIGAN *et al.*, 1997).

A técnica do PCR (“Reação de Polimerização em Cadeia”) constitui ferramenta essencial nos estudos de Biologia molecular. Esta técnica consiste na amplificação de segmentos (genes), por exemplo, da região RNAr 16S, a partir da utilização de *primers* homólogos às regiões conservadas do gene (HEUER *et al.*, 1997). *Primers* são estruturas que possuem regiões – nucleotídeos - pareados, necessários à síntese de novas fitas de ácidos nucléicos (DNA ou RNA). Conseqüentemente, para cada início de síntese de fitas de DNA ou RNA, faz-se necessária a presença de um *primer* (SCHRANK & SILVA, 2000)

Figura 5 – Etapas experimentais em Biologia molecular para estudos da diversidade e organização de comunidades microbianas.

Fonte: modificado de MUYZER & RAMSING, 1996

A técnica de PCR permite a amplificação de pequenas amostras de DNA milhões de vezes, em apenas poucas horas. Nesse processo, o DNA é desnaturado, empregando-se elevadas temperaturas (94 – 96°C), os *primers* são, então, hibridados, à temperatura em torno de 30 – 60°C, e, em seguida, a síntese de DNA é realizada com DNA-polimerase e desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs). A repetição dessas etapas, por número variável de ciclos (20 a 30, por exemplo), permite a amplificação de um segmento de DNA (SOLOMON *et al.*, 1993; PASSAGLIA & ZAHA, 2000).

Dessa forma, cada ciclo do PCR é composto por três etapas: desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão das novas fitas de DNA (CATTONY, 2001).

Os experimentos iniciais do PCR foram realizados com a enzima (termossensível) Klenow (DNA Polimerase da *E. coli*). Dessa forma, a cada passo de desnaturação a enzima era inativada e mais enzima necessitava ser adicionada. Posteriormente, passou-se a utilizar a DNA polimerase de uma bactéria termoresistente (*Thermus aquaticus*) – Taq-DNA-Polimerase -, e, como essa enzima é termoestável, não houve necessidade de adição de novas enzimas a cada ciclo de desnaturação (PASSAGLIA & ZAHA, 2000).

A amplificação de fragmentos de RNA também é possível, a partir da técnica do PCR. Neste caso, o procedimento recebe o nome de PCR de transcrição reversa (RT – PCR), e a enzima empregada é outra, a DNA polimerase de transcrição reversa, denominada RT – DNA Polimerase (ROSADO *et al.*, 1997; JOHNSON, 2000).

3.8.3 Técnica da Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

Técnicas de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) são freqüentemente aplicadas em estudos sobre ecologia microbiana, no sentido de analisar a diversidade e a dinâmica de comunidades microbianas em ambientes naturais (MUYZER *et al.*, 1993; ROSADO *et al.*, 1997; CASAMAYOR, 2000).

Essa técnica permite a separação de fragmentos de DNA com a mesma extensão, anteriormente amplificados por PCR, de acordo com as diferentes seqüências de nucleotídeos (WATANABE *et al.*, 2001).

A separação das diferentes seqüências de pares de bases no DGGE está relacionada com a mobilidade eletroforética da dupla hélice da molécula de DNA parcialmente dissociada em gel de poliacrilamida contendo gradiente linear de desnaturantes de DNA, mistura de uréia e formamida (ROSADO *et al.*, 1997; SAKAMOTO, 2001).

Na dissociação do fragmento de DNA, ou seja, no alargamento dos pares de bases, devido ao aumento da concentração do desnaturante, ocorre a transição da forma helicoidal para a forma de um fragmento parcialmente dissociado, e a migração então é interrompida. De acordo com as diferenças na seqüência de determinados fragmentos de DNA que migram no gel, estes irão se posicionar em diferentes locais, sendo, assim isolados (MUYSER *et al.*, 1993; JASPERS & OVERMANN, 1997; CATTONY, 2001).

Técnicas de eletroforese de fragmentos de RNAr 16S, amplificados por reações em PCR, têm oferecido novas oportunidades para a determinação da diversidade genética das complexas comunidades microbianas. Essas técnicas têm, ainda, contribuído para o estudo das relações filogenéticas desses grupos (MUYSER *et al.*, 1993).

CATTONY (2001), realizou estudos utilizando a técnica de DGGE para avaliação dos efeitos do aumento da temperatura, causado pela queima de canavial, na estrutura da comunidade bacteriana de solo. Nesse estudo, o DNA da comunidade bacteriana foi amplificado utilizando conjunto de *primers* específicos para o Domínio *Bacteria* e para o grupo de actinomicetos. Os produtos de amplificação foram analisados por DGGE, o qual, não relevou alterações nos padrões de bandas, ou seja, não houve alterações na estrutura da comunidade bacteriana do solo de canavial depois da queima.

SAKAMOTO (2001) utilizou a técnica de DGGE para comparação da estrutura de comunidades microbianas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica de fósforo em excesso. O referido autor verificou que a estrutura da comunidade microbiana foi complexa e que algumas populações eram semelhantes e persistiram ao longo da operação do sistema de

tratamento. No entanto, foi constatado também o desaparecimento e o surgimento de algumas populações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Com inóculo proveniente de sedimento de lagoa facultativa para o tratamento de água residuária de abatedouro de frango (PEREIRAS – SP), foram montadas Colunas de Winogradsky utilizando meio de cultura específico para o crescimento de sulfobactérias fototróficas verdes.

As amostras de sulfobactérias verdes obtidas das colunas de Winogradsky foram enriquecidas utilizando o mesmo meio de cultura. Posteriormente, as amostras provenientes do enriquecimento foram utilizadas como inóculo nos reatores em batelada para a avaliação da utilização de sulfeto por esses microrganismos. Foram testadas seis diferentes concentrações de sulfeto. Os ensaios foram realizados em duplicata. Ao término de cada ensaio o conteúdo de cada reator foi descartado. Para cada concentração de sulfeto utilizada, nova inoculação foi realizada. A Figura 6 apresenta o fluxograma experimental dos ensaios com sulfobactérias fototróficas verdes.

Nesse fluxograma as etapas experimentais estão representadas por Fases: I, II, III e IV. A Fase I refere-se à preparação da Coluna de Winogradsky, na qual, foram utilizados 500mL de meio de cultura e 500mL de inóculo (proveniente de sedimento de lagoa facultativa), portanto, o volume de reação (V_1) da coluna foi de 1000mL. Na Fase II, 400mL, ou seja, 40% de V_1 , foi utilizado como inóculo para a realização do primeiro ensaio de enriquecimento de sulfobactérias fototróficas verdes. Nesta Fase, o volume de meio de cultura foi de 600mL. Portanto, o volume de reação (V_2) deste ensaio de enriquecimento foi de 1000mL. Um segundo ensaio de enriquecimento (Fase III) das sulfobactérias verdes foi, ainda, realizado. Nesta Fase foi utilizado 25%, ou seja, 250mL de inóculo proveniente do ensaio de enriquecimento (V_2). Foi utilizado 750mL de meio de cultura. Dessa forma, o volume de reação (V_3) deste segundo ensaio de enriquecimento foi de 1000mL.

Figura 6: Fluxograma do procedimento experimental dos ensaios com sulfobactérias fototróficas verdes.

A Fase IV correspondeu aos ensaios realizados em reatores em batelada. Nesses ensaios, as concentrações iniciais de sulfeto foram distintas. No entanto, foi utilizada sempre a mesma origem e volume (7%) de inóculo. Esse inóculo, foi proveniente do segundo ensaio de enriquecimento (V_3).

A resposta de crescimento foi avaliada através da determinação de proteína total. Os resultados das análises de sulfeto e proteína total foram utilizados para obtenção dos parâmetros cinéticos de crescimento da cultura enriquecida.

4.1 Preparação da Coluna de Winogradsky

Na Figura 7 é apresentada uma coluna típica de Winogradsky, indicando as zonas de pigmentações relacionadas com os tipos específicos de microrganismos.

Neste trabalho foram preparadas Colunas de Winogradsky, em duplicata, com o objetivo de selecionar sulfobactérias fototróficas verdes. A utilização dessa técnica foi realizada em frascos de Duran de 2L, preenchidos com aproximadamente 500mL de inóculo e 500mL de meio de cultura específico para sulfobactéria verde, e o *headspace* (1L) foi preenchido com a mistura de N_2/CO_2 (70/30%).

Foi utilizado o meio de cultura descrito por PFENNIG (1989), com concentração de sulfeto ($Na_2S \cdot 9H_2O$) de 320mg-S/L. O meio de cultura foi esterilizado e submetido à atmosfera de N_2/CO_2 (70/30%).

As colunas foram seladas com tampa de butil e rosca plástica, e incubadas à temperatura de $30 \pm 1^\circ C$ com lâmpada fluorescente de 20 Watts, em ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Com uma distância de 19,5cm da fonte luminosa. Após sete dias as colunas foram mantidas em ciclos de 24 horas de claro, a fim de proporcionar rápido desenvolvimento das bactérias.

Figura 7: Coluna típica de Winogradsky.(INTERNET, 2002; Home page:<http://people.clemson.edu/~skipper/Winogradsky/Slide1.GIF>)

4.2 Meio de Cultura

Na preparação das Colunas de Winogradsky, enriquecimento e nos ensaios em reatores em batelada foi utilizado o meio de cultura descrito por PFENNIG (1989). As Tabelas 1 e 2 apresentam, respectivamente, a composição do meio de cultura e a solução traço de metais.

Todas as soluções foram esterilizadas por filtração em sistema MILLIPORE com membrana de 0,22µm de diâmetro de poro. As soluções estoque de bicarbonato (NaHCO_3) e vitamina (B_{12}) foram submetidas à atmosfera de nitrogênio (100%). Todo material e vidraria utilizados na preparação do meio de cultura e soluções estoque, foram esterilizados em autoclave, à temperatura de 121°C e pressão de

1atm, por 20 minutos. O meio de cultura foi esterilizado às mesmas condições descritas anteriormente, e posteriormente submetidos à atmosfera de N_2/CO_2 (70/30%), antes da inoculação.

Tabela 1: Composição do meio de cultura para sulfobactérias verdes.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1000mL de água Milli-Q
KH_2PO_4	0,30g
NH_4Cl	0,34g
KCl	0,34g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,15g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50g
Solução traço de metais	1,00mL
Solução de $NaHCO_3$ 10% (p/v)	15ml
Solução de vitamina B_{12} (2mg em 100ml)	1,0mL
pH	6,7
Atmosfera de N_2/CO_2	70/30%

Fonte: PFENNIG (1989)

O procedimento para preparação do meio de cultura está descrito a seguir:

- pesar e dissolver os sais em aproximadamente 500mL de água Milli-Q;
- adicionar 1,0mL da solução traço de metais e 1,0mL de vitamina B_{12} , com auxílio de seringa e agulha estéreis, à solução de sais;
- adicionar 15mL de bicarbonato ($NaHCO_3$), ajustando o pH a 6,7;
- finalizar o volume em 1000mL com água Milli-Q;
- fluxionar N_2/CO_2 (70/30%) por aproximadamente 15 minutos;

- filtrar o meio de cultura em sistema MILLIPORE utilizando membrana de 0,22µm de diâmetro de poro, previamente esterilizada;
- distribuir a solução estéril em frascos de antibióticos, previamente autoclavados, sob fluxo de N₂/CO₂(70/30%).

Tabela 2: Composição da solução traço para sulfobactéria verde.

Componentes	Quantidades - q.s.p. 1000mL de água Milli-Q
- HCl 25% (p/v)	10,0ml
- FeSO ₄ 7H ₂ O	2,0g
- CoCl ₂ 6H ₂ O	190mg
- MnCl ₂ 4H ₂ O	100mL
- ZnCl ₂	70,0mg
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	36mg
- NiCl ₂ 6H ₂ O	24mg
- H ₃ BO ₃	6,0mg
- CuCl ₂ 2H ₂ O	2,0mg

Fonte: PFENNIG (1989)

A solução traço de metais foi preparada da seguinte forma:

- pesar os sais;
- adicionar HCl (25%) em FeSO₄7H₂O;
- adicionar os demais sais, dissolvendo-os em água Milli-Q;
- completar o volume (1000mL) com água Milli-Q;
- distribuir a solução em frascos de Duran (500mL);
- esterilizar a solução em autoclave.

A solução de sulfeto ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) foi preparada da seguinte forma:

- ferver por 20 minutos, aproximadamente 400mL de água Milli-Q,
- após fervura e ligeiro resfriamento, submeter essa água à atmosfera de N_2 (100%);
- secar, com auxílio de papel filtro, e pesar 64,0g de sulfeto;
- dissolver esse sulfeto na água ainda quente (aproximadamente 40°C), e sob atmosfera de N_2 (100%), filtrando posteriormente essa solução utilizando sistema MILLIPORE com membrana de 0,22 μm de diâmetro de poro;
- distribuir essa solução estéril de sulfeto em frascos de antibiótico (30mL), previamente autoclavados, sob atmosfera de N_2 (100%), lacrando-os posteriormente.

4.3 Enriquecimento da Cultura

As amostras de sulfobactérias verdes obtidas das colunas de Winogradsky foram enriquecidas nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando dois frascos de Duran (2L). Foram utilizados 40% de inóculo e 600mL de meio de cultura; para o volume total de 1,0L.

Posteriormente, foi realizado o segundo enriquecimento, nas mesmas condições descritas anteriormente; com exceção da concentração de inóculo, que nesse caso foi de 25%. O inóculo foi proveniente do primeiro ensaio de enriquecimento.

Nesta etapa experimental foi mantida a iluminação com uma lâmpada fluorescente de 20 Watts, em ciclos de 24 horas de claro, com concentração de sulfeto ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) de 320mg-S/L

4.4 Ensaaios em Reatores em Batelada

Os reatores em batelada foram elaborados para avaliar a utilização de sulfeto pela cultura enriquecida de sulfobactérias fototróficas verdes. Foram realizados

ensaios em duplicata com as seguintes concentrações de sulfeto: 11,4; 40,5; 147,5; 262,4; 380,8 e 529,6 mg/L.

Os reatores foram preparados em frascos de Duran (2L) preenchidos com 1300mL de solução, sendo 7% de inóculo, proveniente do segundo enriquecimento, e 700mL de *headspace*, sob atmosfera de N₂/CO₂ (70/30%).

Os reatores foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao término de cada ensaio o conteúdo dos reatores foi descartado e para cada concentração de sulfeto utilizada, nova inoculação e incubação foram realizadas.

As etapas previamente descritas estão demonstradas no fluxograma do procedimento experimental apresentado na Figura 6.

4.5 Exames Microbiológicos

Os exames microbiológicos de rotina, para caracterização morfológica foram realizados em todos os ensaios, em microscopia óptica comum e contraste de fase utilizando Microscópio Olymplus BX60, acoplado a câmara com captura de imagem e software Image-Pro Plus.

4.6 Método para Determinação de Sulfeto Total

Para acompanhar o consumo de sulfeto durante o crescimento da cultura de sulfobactérias fototróficas verdes foi utilizado o método do azul de metileno, descrito por QUENTIN & PACHMEYER e modificado por PLAS *et al.* (1992).

No método do azul de metileno, o volume necessário para amostragens é de 200µL, evitando a retirada excessiva de amostras, principalmente quando se trabalha com volumes reduzidos. A concentração de sulfeto total presente nas amostras foi determinada através de uma curva padrão previamente elaborada para sulfeto de sódio (Apêndice 1). A seguir está apresentado o procedimento para determinação de sulfeto total.

➤ Procedimento:

- misturar 200 μ L da amostra com 10 mL de acetato de zinco (0,01M);
- adicionar 1mL da solução de dimetil-*p*-fenilenodiamina (DMPD) e 70 μ L de sulfato férrico amoniacal, misturando vigorosamente;

Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente, realizar a leitura de absorbância em 663nm. O procedimento deve ser realizado em tubos fechados. Quando a análise não for realizada imediatamente, armazenar a amostra com acetato de zinco a 4°C, por no máximo 24 horas.

O “branco”, na leitura do sulfeto, é constituído por água Milli-Q, previamente fervida e mantida em fluxo de N₂ (100%), no mesmo volume para as amostras (200 μ L).

4.6.1 Solução de Acetato de Zinco

O procedimento para a preparação da solução de acetato de zinco foi o seguinte:

- dissolver 20 gramas de acetato de zinco com 0,2mL de ácido acético, em 1000mL de água Milli-Q.

4.6.2 Solução de Dimetil-*p*-Fenilenodiamina

O procedimento para a preparação da solução de dimetil-*p*-fenilenodiamina é descrito a seguir:

- dissolver 2,0 gramas de dimetil-*p*-fenilenodiamina $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{SO}_4$ em 20mL de água Milli-Q e sob resfriamento

com gelo, adicionar 200mL de H_2SO_4 (96%), gota a gota. Completar o volume da solução com água Milli-Q, para 1000mL e armazená-la a 4°C.

4.6.3 Solução de Sulfato Férrico Amoniacal

O procedimento para a preparação da solução de sulfato férrico amoniacal está descrito da seguinte forma:

- dissolver 2mL de H_2SO_4 em 50mL de água Milli-Q e adicionar 10 gramas de sulfato férrico amoniacal. Completar o volume para 100mL com água Milli-Q e armazenar a solução no escuro a 4°C.

4.7 Método de Determinação de Enxofre

Para a determinação de enxofre elementar foi utilizado o método descrito por VARESCHE (1997), utilizando enxofre ressublimado com etanol (96%). A curva padrão do enxofre está apresentada no Apêndice 2.

O procedimento para determinação de enxofre elementar está descrito a seguir:

- centrifugar volume conhecido de suspensão celular;
 - desprezar o sobrenadante e ressuspender o material em água Milli-Q.
- Realizar este procedimento duas vezes.
- ressuspender o material em etanol (96%) e armazenar à temperatura ambiente, no escuro, por quatro horas;
 - centrifugar o material e fazer leituras de absorbância em 260nm e 772nm.

4.8 Método de Rompimento Celular

Em relação à quantificação do crescimento celular, no estudo da cinética de crescimento, algumas técnicas como determinação de massa seca, densidade ótica, proteína celular e mesmo bacterioclorofila podem ser empregadas.

No entanto, em virtude da presença de enxofre elementar, a aplicação das técnicas de densidade ótica e da massa seca de células torna-se inviável para acompanhar o desenvolvimento microbiano, considerando que a quantidade de enxofre varia em função da concentração e da disponibilidade de sulfeto e portanto não será um bom indicativo para tal parâmetro, visto que estará quantificando enxofre e células (VARESCHE, 1997). Ainda a aplicação dessas metodologias poderia ser inviável em função, também, da presença de pigmentos fotossintéticos (bacterioclorofilas e carotenóides), presentes nas células.

Nesse aspecto, em relação aos procedimentos existentes, neste trabalho optou-se pela metodologia utilizada no trabalho com bactérias púrpuras realizado por VARESCHE (1997), que consiste na determinação de proteína total. A escolha dessa metodologia está de acordo com a disponibilidade, no laboratório, dos equipamentos e soluções para a sua realização, assim como a viabilidade de se obter resultados confiáveis quanto ao acompanhamento do crescimento celular.

Portanto, entre as técnicas disponíveis para o acompanhamento do crescimento celular, optou-se pela determinação de proteína total, segundo o método de LOWRY (1951), modificado por PETERSON (1977). Para a realização dessa técnica é necessário romper as células.

O rompimento celular da cultura de sulfobactérias fototróficas verdes foi realizado segundo a metodologia descrita por BHADURI & DEMCHICK. Esse método envolve o tratamento das células com acetona, seguido pela extração da proteína celular pelo dodecil sulfato de sódio (SDS), que será posteriormente determinada pelo método de LOWRY (1951), modificado por PETERSON (1977). A seguir, o método encontra-se descrito detalhadamente:

- retirar a amostra do frasco de cultura e distribuir em tubos de centrífuga (15mL);

- centrifugar a 6000rpm por 15 minutos;
- desprezar o sobrenadante com auxílio de uma seringa;
- ressuspender as células em tampão salino-fosfato e agitar no vórtex;
- centrifugar a 6000rpm por 15 minutos;
- desprezar o sobrenadante, ressuspender as células em tampão salino-fosfato e agitar no vórtex;
- centrifugar a 6000rpm por 15 minutos;
- desprezar o sobrenadante;
- ressuspender as células em acetona (P.A.), mantida no congelador, a 50% do volume total da amostra;
- deixar 10 minutos a amostra (células + acetona) em banho de gelo;
- centrifugar a 6000rpm por 15 minutos;
- desprezar o sobrenadante;
- fluxionar nitrogênio (N₂) na amostra para remover a acetona residual;
- ressuspender a amostra em dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e deixar em repouso por 2 minutos;
- adicionar soda para obter concentração final de 1N e deixar em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos;
- centrifugar a 6000rpm por 15 minutos;
- retirar 0,5mL do sobrenadante e efetuar a dosagem de proteínas pelo método de LOWRY (1951), modificado por PETERSON (1977).

4.9 Método de Determinação de Proteína Total

No método para determinação de proteína celular, descrito por LOWRY (1951) e modificado por PETERSON (1977), a concentração de proteínas foi obtida através da curva de calibração expressa em miligramas de soro de albumina bovina por litro (Apêndice 3). Essa metodologia encontra-se descrita a seguir:

- adicionar 5mL do reagente D em frasco com tampa;
- em seguida adicionar 0,5mL do sobrenadante resultante da extração de proteína das células;
- agitar no vórtex;
- efetuar um “branco” substituindo a amostra por soda 1N;
- após 20 minutos, adicionar 0,5mL do reativo de Folin Ciocalteau (1N);
- agitar no vórtex;
- deixar em repouso por 30 minutos;
- efetuar a leitura em absorbância no comprimento de onda de 750nm.

4.9.1 Solução D

A solução D foi preparada utilizando:

- 2mL de solução 0,5% de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- 2mL de solução 1% de tartarato de sódio e potássio;
- completar o volume em balão volumétrico de 100mL com solução 2% de carbonato de sódio em soda 1N.

4.9.2 Solução de Folin Ciocalteau

A solução de Folin Ciocalteau (2N) foi preparada diluindo em volumes iguais a solução de Folin com água Milli-Q.

4.9.3 Preparação da Curva de Calibração com Soro Albumina Bovina

O resultado deste método foi expresso em miligramas de soro albumina bovina (SAB) por litro. A metodologia encontra-se descrita a seguir:

- secar a soro albumina bovina em estufa a 36°C por 24 horas;

- dissolver a soro albumina bovina em água Milli-Q de forma a obter uma solução de 0,1g/L;
- preparar concentrações na faixa de 50 a 600mg/L, com soda 1N, a partir da solução inicial;
- proceder à dosagem dos padrões como descrito anteriormente.

4.10 Parâmetros de Avaliação da Cinética de Crescimento

Nos estudos de cinética de crescimento sob diferentes concentrações de sulfeto, as determinações de proteína total, sulfeto total e enxofre elementar foram realizadas em duplicata ao longo do tempo, sendo a média dos valores de absorbância utilizada no cálculo das respectivas concentrações.

A determinação da velocidade específica na fase exponencial de crescimento (μ) foi feita graficamente. Neste método, projetaram-se os valores do logaritmo neperiano da concentração celular *versus* o tempo de cultivo e identificaram-se os pontos que possuíam a maior probabilidade de alinharem-se numa mesma reta. Estes corresponderam à fase exponencial de crescimento, na qual a velocidade é máxima e constante (VARESCHE, 1997). Através do cálculo da regressão linear dos pares de pontos, determinou-se a equação da reta, cujo coeficiente angular correspondeu ao μ .

Estabelecida a fase exponencial de crescimento, e a partir do cálculo da velocidade de crescimento (μ), foi possível calcular o tempo de geração da cultura (T_g), a partir da Equação 5; assim como foi possível, também, calcular o fator de conversão de substrato em microrganismo ($Y_{x/s}$), a partir da Equação 6.

É importante ressaltar que o fator de conversão mencionado acima foi utilizado como parâmetro relativo à utilização de sulfeto, e não, por exemplo, relacionado à utilização de substrato orgânico. Dessa forma, o coeficiente de conversão ($Y_{x/s}$) representou, neste estudo, o crescimento de microrganismos em relação ao sulfeto consumido.

4.11 Técnicas de Biologia molecular

Para a realização desta etapa do trabalho, as seguintes fases foram necessárias: a extração dos ácidos nucleicos; a amplificação da amostra extraída através do PCR; em seguida, a amostra foi submetida à eletroforese em gel, com gradiente desnaturante (DGGE).

4.11.1 Extração dos Ácidos Nucleicos

No presente trabalho foi utilizado o protocolo de MELVIN & HOBSON (1994), descrito a seguir:

- centrifugar 3,0 mL (pode ser até 10 mL) da amostra de lodo (tubo de propileno), a 6000 RPM por 2 minutos, descartar o sobrenadante;
- lavar o pellet com 3,0 mL PBS (pH 7,4), centrifugar a 6.000 rpm por 3 minutos;
- ressuspender o precipitado com 1,0 mL de tampão TESC (pH 8,3);
- congelar a amostra a -80°C por 15 minutos (ou O/N à -20°C).
- descongelar a amostra, em seguida, centrifugar por 3 minutos, descartar o sobrenadante;
- ressuspender o *pellet* em 300 μL de tampão TESC;
- adicionar 5,0 μL de *DMSO a esse volume;
- manter a amostra por 1 min à temperatura ambiente;
- misturar a amostra usando vortex por 3 a 5 min;
- adicionar os seguintes reagentes na ordem:
 - 500 μL de guanidina tiocianato 5M;
 - 500 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v)
- agitar no vortex e centrifugar à 6.000 rpm por 10 min;
- transferir a fase aquosa ($\pm 1,0\text{mL}$) para outro tubo;
- adicionar 50% do volume da fase aquosa de acetato de amônio 7,5M (não precisa acertar o pH) ou acetato de sódio 3M (pH 5,0-6,0);

- misturar e dividir em 3 tubos;
- precipitar o DNA adicionando-se 2,5 volumes de etanol absoluto e agitar levemente;
- centrifugar a amostra a 6.000 rpm por 10 min, descartar o sobrenadante;
- lavar o DNA com 300 µL de etanol 70% invertendo-se o tubo várias vezes;
- centrifugar 6.000 rpm por 3 min descartar o sobrenadante com cuidado;
- secar em estufa 37° C por 30 min ou em temperatura ambiente;
- ressuspender o *pellet* em 50-100 µL de tampão TE (pH 8,3) ou água Milli-Q estéril. Guardar o produto da extração em geladeira a 4,0°C.

*Substância tóxica – manipular com cuidado e usar luvas.

As soluções PBS, TESC, DMSO e TE foram preparadas segundo SAKAMOTO (2001).

4.11.2 Amplificação do Gene através da Reação de Polimerização em Cadeia

No presente trabalho, a partir do DNA extraído da amostra, foram obtidos fragmentos de DNAr 16S, utilizando a técnica do PCR com *primers* homólogos à regiões conservadas do gene RNAr 16S. Os *primers* utilizados estão mostrados na Tabela 3. As amplificações foram realizadas com o uso de um termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.).

O procedimento para a amplificação dos ácidos nucleicos será apresentado nos itens a seguir:

Tabela 3: *Primers* utilizados nos experimentos com PCR

Domínio	<i>Primers e Sequência (5' → 3')</i>
<i>Bacteria</i>	968 FGC (5' - AACGCGAAGAACCTTAC -3')
	1392 R (5' - ACG GGC GGT GTG TAC -3')
	GC clamp (5' - CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG -3')

Fonte: NIELSEN *et al.*, (1999)

a) o procedimento para o preparo da solução para PCR de uma amostra está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Procedimento para o preparo da solução de PCR.

Nº de amostras	dH ₂ O	10 x Tampão PCR (50mM MgCl ₂)	dNTP (2mM)	Primer forward (100pmol/L)	Primer reverse (100pmol/L)	Ampli Taq (5 U/μL)	Template
1	40,7μL	5 μL	0,4 μL	0,5 μL	0,5 μL	0,4 μL	1 μL

Fonte: HEUR *et al.*, (1997)

b) foram utilizados os seguintes controles positivos:

- *Pseudomonas* sp.
- *Allochromatium vinosum* (DSM 183)

c) as condições de amplificação dos genes (Domínio *Bacteria*, HEUER *et al.*, 1997) estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições utilizadas na programação do aparelho para amplificação dos fragmentos de ácidos nucleicos por PCR.

Nº de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Final da extensão	Resfriamento
35	94° C 5 minutos	94° C 45 segundos	63° 60 segundos	72° C 2 minutos	72° C 10 minutos	4° C

Fonte: HEUR *et al.*, (1997)

4.11.3 Eletroforese em Gel de Agarose.

Essa etapa experimental comumente é utilizada para avaliar o produto resultante da extração do ácido nucleico e da amplificação do gene por PCR. O procedimento experimental é o mesmo, diferindo apenas na concentração de agarose e no marcador, assim, para verificar o produto do ácido nucleico, a concentração de agarose é de 1% e o marcador é o λ Hind III fragment. Para avaliar o produto da amplificação por PCR a concentração de agarose é de 1,5%, e o marcador é o ϕ K 174 HAE III digest. O procedimento dessa etapa experimental está apresentado abaixo:

- preparar as soluções 1% ou 1,5 %, de agarose mais solução tampão TAE X 1;
- preparar a “bandeja,” colando fita crepe dos lados;
- despejar o gel na “bandeja” em seguida coloca-se o “pente”, para formar as cavidades (poços);
- esperar 30 minutos para o gel solidificar;
- retirar o “pente” e a fita crepe;
- preparar a amostra no parafilme usando 5,0 μ L de extrato de ácido nucleico ou produto do PCR com 2,0 μ L de loading dye;
- misturar bem a amostra com auxílio de uma pipeta automática;
- transferir as amostras nas “cavidades” do gel;

- colocar a bandeja no aparelho, neste trabalho utilizou-se o Pharmacia Biotech GNA 100 (com programação de 75 V constante, por 30 minutos), e submerge-se em tampão TAE X 1;
- transferir-se o gel numa vasilha com brometo de etídio com auxílio de uma espátula e deixa-se por 15 minutos;
- lavar o gel em outra vasilha, com água Milli-Q, por 5 minutos;
- colocar na câmara de transiluminador UV (Stratagene® - Eagle Eye II).

Observação: Brometo de etídio é uma substância cancerígena, assim o reagente deve ser manipulado sempre com luvas e muito cuidado.

O tampão TAE foi preparado utilizando a metodologia descrita por SAKAMOTO (2001).

4.11.4 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante

Essa análise tem por objetivo a separação dos fragmentos dos genes amplificados por PCR. A separação desses fragmentos ocorre de acordo com o grau de desnaturação da dupla hélice de DNA sob a ação de agentes desnaturantes. O procedimento dessa análise é o seguinte:

- preparar a solução do gel na concentração desejada. Neste trabalho, utilizaram-se soluções de concentrações 0%, 30% e 60%, preparadas de acordo com a Tabela 6;
- dissolver a uréia nos reagentes líquidos e completar o volume até 100mL, com água Milli-Q;
- filtrar a solução com auxílio de membrana de porosidade de 0,2µm;

Tabela 6: Procedimentos para o preparo da solução do gel de gradiente desnaturante.

Concentração do gel – DGGE (%)	0%	30%	60%
40% de gel de acrilamida (mL)	20	20	20
Solução de 50 x TAE (mL)	2	2	2
Formamida (mL)	0	12	24
Uréia (g)	0	12,6	25,2

Fonte: SAKAMOTO, 2001

- preparar o “sanduíche” com o Kit de placas de vidro e suporte;
- preparar os três géis, utilizando-se a solução descrita na Tabela 6, da seguinte forma:
 - em tubos de centrífuga* de 15mL, adicionar 14mL da solução de 60%, 100μL de solução corante (azul de metileno); 100μL de 10% APS; 10μL de temed**.
 - em tubos de centrífuga* de 15mL, adicionar 14mL da solução de 30%, 100μL de 10% APS; 10μL de temed**.
 - em tubos de centrífuga* de 15mL, adicionar 3mL da solução de 0%, 20μL de 10% APS; 2μL de temed**.
- * os tubos de centrífuga com as soluções são mantidos em gelo, enquanto é realizada a preparação dos géis;
- ** o temed é adicionado por último, pois este reagente provoca a solidificação do gel.
- transferir os géis (30% e 60%) simultaneamente para o “sanduíche” de placas de vidro, com auxílio de duas seringas presas ao aparelho injetor;
- após 10 minutos, colocar uma placa semelhante a um pente, para formar as cavidades. Em seguida, adicionar a solução do gel 0%;
- aguardar, no mínimo, 1 hora, ou uma noite, para os géis solidificarem;
- preparar a “câmara eletroforética”, adicionando-se 140mL de 50 x TAE e completar para 7 litros, com água Milli-Q;

- colocar para aquecer a solução à temperatura de 65°C, no entanto, na “corrida do gel”, utilizar temperatura constante de 60°C;
- quando a temperatura de “câmara eletroforética” atingir os 65°C, transferir o “sanduíche” para essa câmara;
- retirar o “pente” e lavar as células ou cavidades formadas pelo “pente” no gel, com solução tampão, utilizando micropipetas;
- preparar as amostras, misturando 20µL de amostra (“template”) com 4µL de 6 x loading dye;
- transferir a mistura (amostra + corante) para as células ou cavidades do gel;
- ligar a bomba de agitação e conectar nos eletrodos, à voltagem de 130V;
- após o tempo de “corrida” do gel, adicionar a solução de Vista green* (diluída 10.000 vezes), aguardar 15 minutos;
- colocar o gel na câmara de transiluminador UV (Stratagene® - Eagle Eye II).
- fazer a leitura do resultado (nesse caso foi utilizado o software Eagle Eye II).

* Vista green: substância cancerígena - deve-se manipular sempre com muito cuidado e com luvas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados sobre o enriquecimento, a utilização de sulfeto, a cinética de crescimento de sulfobactérias fototróficas verdes e a caracterização microbiana.

5.1 Coluna de Winogradsky e Enriquecimento da Cultura

A utilização de amostra de sedimento de lagoa facultativa foi considerada como provável nicho ecológico de bactérias fototróficas. As condições ambientais em que essa amostra foi obtida sugeriam a incidência de luz natural e a degradação microbiana da matéria orgânica, sob condições limitantes de oxigênio ou em anaerobiose, segundo MADIGAN (1988), requisitos essenciais para a presença desses microrganismos.

Lagoas e sedimentos, contendo compostos de enxofre, constituem habitats naturais de sulfobactérias fototróficas verdes e púrpuras. Ainda, em função de suas características metabólicas, essas bactérias apresentam nichos ecológicos semelhantes. No entanto, as sulfobactérias fototróficas verdes são fisiologicamente mais restritas que as púrpuras. As bactérias verdes são incapazes de depositarem enxofre elementar intracelularmente, esse fato é crucial em períodos de depleção de sulfeto. Ainda, em contraste com a maioria das bactérias púrpuras, as verdes não possuem a capacidade de se ajustarem (movimentarem) em relação às condições ótimas de crescimento, por exemplo, à presença de diferentes concentrações de sulfeto na coluna d'água (BIEBL & PFENNIG, 1978). Esse fato relaciona-se diretamente à característica que essas bactérias têm de não apresentarem mobilidade (PFENNIG & TRUPER, 1989).

Quanto à amostra proveniente de sedimento da lagoa facultativa, a observação microscópica dessa, revelou a presença de ampla diversidade morfológica, tais como, bacilos, cocos, vibrios, além de algas e protozoários.

Em relação ao enriquecimento, a partir da montagem das colunas de Winogradsky, o inóculo mostrou-se apropriado ao enriquecimento com meio de cultura específico para sulfobactéria verde. Nas colunas de Winogradsky observou-se o aparecimento de pontos esverdeados, característicos de sulfobactérias fototróficas verdes, sete dias após a incubação.

Na Figura 8 é mostrado o aspecto visual das colunas de Winogradsky preparadas e incubadas à $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob iluminação, com aproximadamente 320mg-S/L de sulfeto.

Figura 8: Aspecto visual das Colunas de Winogradsky .

O aparecimento de pontos esverdeados, observáveis a olho nu nas colunas, sugeriram a presença de sulfobactérias fototróficas verdes, as quais foram confirmadas com a utilização de microscopia óptica comum, onde foram observados bacilos com coloração verde, semelhantes a *Chlorobium*. Nessa mesma análise foi observada também a presença de enxofre extracelular (Figura 9). Para associar as morfologias observadas com gêneros de sulfobactérias foi consultado o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (PFENNIG & TRUPER, 1989).

Figura 9: Aspecto morfológico de células semelhantes à *Chlorobium* e enxofre extracelular.

Segundo PFENNIG & TRUPER (1989), as bactérias do gênero *Chlorobium* apresentam aspectos morfológicos variados, por exemplo, células em forma de bacilos curvos ou alinhados, ovais ou espirais. Essas morfologias celulares geralmente apresentam extensão de 0,4 a 3,0 μm . Essas células não apresentam mobilidade. As culturas normalmente possuem cores verde ou marrom, as quais podem ser reconhecidas visualmente e através de microscopia ótica comum.

Na seleção das bactérias fototróficas no ambiente enriquecido da coluna de Winogradsky foram observadas morfologias que apresentaram respostas de crescimento, principalmente, devido à disponibilidade de luz e à presença de sulfeto. Como salientado anteriormente, foram utilizadas lâmpadas fluorescentes de 20Watts e as colunas mantidas sem agitação.

Todas as espécies da Família *Chlorobiaceae* são fotoautotróficas anaeróbias, dessa forma a presença de luz constitui fator limitante para o crescimento dessas; assim como a necessidade de sulfeto como doador de elétrons para a assimilação de CO_2 (TRÜPER & PFENNIG, 1992).

Outro aspecto importante que contribuiu para a dinâmica populacional foi o meio de cultura. Os resultados do enriquecimento mostraram que o meio utilizado para sulfobactérias fototróficas verdes foi seletivo, favorecendo o crescimento de determinados representantes das sulfobactérias verdes na coluna de Winogradsky.

VARESCHE (1997) também utilizou esse procedimento para obtenção de culturas de *Chromatium* sp (sulfobactéria púrpura). Especificamente nesse caso, foi utilizado como inóculo, lodo granulado de reator UASB alimentado com glicose.

Portanto, todos esses resultados confirmaram a eficiência da utilização da coluna e também a diversidade funcional dos organismos fototróficos nos diferentes ambientes.

5.2 Avaliação da Utilização de Sulfeto por Sulfobactérias fototróficas verdes.

Neste capítulo será abordado o consumo de sulfeto total, em função do tempo, ao longo dos ensaios em reatores em batelada; considerando como referência as diferentes concentrações iniciais desse composto.

Na realização dos ensaios em reatores em batelada foi avaliada a influência do sulfeto no crescimento da cultura. Essas análises foram essenciais para a avaliação da utilização desse composto pela cultura enriquecida de sulfobactérias fototróficas verdes, assim como para a determinação dos limites dessas bactérias em relação à toxicidade exercida pelo sulfeto.

Para melhor elucidação dos resultados, são apresentadas, a seguir, Tabelas (Tabelas 7 a 12) e Figuras (Figuras 10 a 15), que correspondem à cada ensaio em reatores em batelada.

Deve-se destacar que para a realização desses ensaios, foi utilizado inóculo da mesma origem, como mostrado na Figura 6. No entanto, para todos os ensaios não foi realizada a lavagem do inóculo, ou seja, foram transferidos diretamente as células, o meio de cultura e o enxofre elementar para realizar os ensaios com determinada concentração de sulfeto.

Os valores apresentados nas Tabelas 7 a 12 e nas Figuras 10 a 15 correspondem às médias obtidas na determinação dos parâmetros de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar.

Tabela 7: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 11,4mg/L de sulfeto.

Tempo (h)	Concentração de sulfeto total (mg-S/L)	Concentração de proteína total (mg-SAB/L)	Concentração de enxofre extracelular (mg-S/L)
0	11,4	23,9	4,4
1,0	11	26	7,8
3,0	10,6	28,5	8,1
6,5	8,8	32,1	7,7
10,5	8,0	37,4	9,8
17,5	5,9	46,4	9,6
21,5	2,4	51,4	12,2
25,5	0,8	45,6	11,9
37,5	0,2	40,3	12,9
49,5		38,9	6,5
63,5		34,9	6,8
66,5		31	6,9
73,5		26,4

Figura 10: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 11,4mg/L de sulfeto.

Tabela 8: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 40,5mg/L de sulfeto.

Tempo (h)	Concentração de sulfeto total (mg-S/L)	Concentração de proteína total (mg-SAB/L)	Concentração de enxofre extracelular (mg-S/L)
0	40,5	24,2	21,1
3,0	36,6	27,4	15,5
6,5	35,5	28,9	15,9
10,5	36,2	36,7	19,4
17,5	32,0	41,0	23,3
25,5	27,4	53,5	32,0
37,5	14,7	64,6	34,0
50,5	5,4	68,1	38,5
62,5	2,2	41,7	30,6
65,5	1,1	35,6	34,8
72,5	0,4	31,7	31,5

Figura 11: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 40,5mg/L de sulfeto.

Tabela 9: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 147,2mg/L de sulfeto.

Tempo (h)	Concentração de sulfeto total (mg-S/L)	Concentração de proteína total (mg-SAB/L)	Concentração de enxofre extracelular (mg-S/L)
0	147,2	27,7	36,8
7	116,8	--	54,8
13	108,8	--	60,0
19	89,6	37,7	55,7
25	68,8	--	51,4
31	36,8	44,8	50,0
37	8,0	47,7	54,4
43	2,6	52,7	52,2
54	--	54,8	50,0
79	--	68,4	55,3
91	--	69,1	--
103	--	75,5	58,3
117	--	94,8	62,4
127	--	84,1	61,5
143	--	77,0	53,3

Figura 12: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 147,2mg/L de sulfeto.

Tabela 10: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 262,4mg/L de sulfeto.

Tempo (h)	Concentração de sulfeto total (mg-S/L)	Concentração de proteína total (mg-SAB/L)	Concentração de enxofre extracelular (mg-S/L)
0	262,4	30,57	50,0
7	217,6	35,57	65,6
19	174,4	58,43	79,9
31	102,4	66,29	108,1
43	56,0	--	94,9
49	25,6	--	114,5
54	12,3	79,14	117,1
79	3,4	--	--
91	0,2	102,71	115,4
105		108,43	109,6
113		79,86	105,0
128		79,86	114,1
136		--	83,1
158		31,29	95,5

Figura 13: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 262,4mg/L de sulfeto.

Tabela 11: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 380,8mg/L de sulfeto.

Tempo (h)	Concentração de sulfeto total (mg-S/L)	Concentração de proteína total (mg-SAB/L)	Concentração de enxofre extracelular (mg-S/L)
0	380,8	25,3	59,3
6	294,4	24,6	--
10	304,0	34,6	64,6
17	304,0	46,0	--
25	291,2	47,4	82,8
37	230,4	48,1	78,3
49	217,6	50,3	84,6
62	153,6	42,4	97,6
73	--	43,1	84,3
85	137,6	41,7	99,9
97	124,8	43,9	76,4
114	102,4	43,1	81,3
126	102,4	40,3	
138	102,4	41,0

Figura 14: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 380,8mg/L de sulfeto.

Tabela 12: Valores médios da concentração de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com 529,6mg/L de sulfeto.

Tempo (h)	Concentração de sulfeto total (mg-S/L)	Concentração de proteína total (mg-SAB/L)	Concentração de enxofre extracelular (mg-S/L)
0	529,6	31,2	30,3
11,5	518,4	41,2	45,5
23,5	524,8	28,4	57,4
47,5	470,4	30,5	69,8
59,5	451,2	39,1	54,8
69,5	452,8	42,7	57,0
81,5	481,6	--	--
95,5	470,4	34,1	46,2
119,5	456,0	--	--
130,0	464,0	38,4	61,9
178,5	440,0	49,8	--
226,0	472,0	39,8	72,6

Figura 15: Variação da concentração de proteína total, consumo de sulfeto e enxofre elementar em função do tempo em reatores em batelada alimentados com 529,6mg/L de sulfeto.

A Tabela 13 apresenta os valores das concentrações iniciais e finais de sulfeto total ao longo da realização dos ensaios em batelada, em função do tempo. É apresentada ainda, a porcentagem de remoção de sulfeto em cada reator.

Considerando o consumo de sulfeto segundo reação de ordem zero (Figuras 10 a 15) é possível estimar a velocidade de consumo de sulfeto a partir da quantidade desse composto que foi consumido nos reatores em batelada, no intervalo de tempo de cada ensaio. Esses resultados são, também, apresentados na Tabela 13 e ilustrados graficamente na Figura 16.

Tabela 13: Valores médios das concentrações inicial e final de sulfeto em função do tempo de consumo, durante o crescimento de *Sulfobactéria* verde nos reatores em batelada.

Concentração de sulfeto total (mg/L)		Tempo (h)	Remoção de sulfeto total (%)	$\Delta S/\Delta t$
Inicial	Final	Δt		mg-S/L.h
11,4	0,2	98,2	37,5	0,299
40,5	0,4	99,0	72,5	0,553
147,2	2,6	98,2	43,0	3,36
262,4	0,2	99,9	91,0	2,88
380,8	102,4	73,1	138,0	2,02
529,6	472,0	10,8	226,0	0,254

A partir da análise das Tabelas 7 a 12, das Figuras 10 a 15 e da Tabela 13, pode-se notar que porcentagens semelhantes de remoção de sulfeto foram obtidas nos ensaios em reatores em batelada com concentrações iniciais de sulfeto de 11,4, 40,5, 147,2 e 262,4 mg-S/L, as quais foram de aproximadamente 98 a 99%.

Figura 16: Variação da velocidade de consumo de sulfeto em função do tempo, em reatores em batelada alimentados com diferentes concentrações de sulfeto

Nos reatores alimentados com concentrações iniciais de sulfeto iguais a 380,8 e 529,6 mg-S/L, as porcentagens de remoção de sulfeto foram inferiores, ou seja, iguais a 73,1% e 10,8%, respectivamente.

Apesar de relativa semelhança nas porcentagens de remoção de sulfeto nos reatores alimentados com 11,4, 40,5, 147,2 e 262,4 mg-S/L, é importante atentar para as velocidades de consumo desses compostos (Tabela 13). Nesse aspecto, notou-se diferenças relativamente importantes no desempenho das sulfobactérias verdes quanto à sua utilização. Para a menor concentração inicial de sulfeto, igual a 11,4 mg/L, a velocidade de consumo foi de 0,299 mg-S/L.h e a porcentagem de remoção foi de 98,2%.

Nos reatores alimentados com concentração inicial de sulfeto de 40,5 mg-S/L, a porcentagem de remoção foi de 99,0%. No entanto, a velocidade de consumo foi de 0,553 mg-S/L.h. Para concentração inicial de sulfeto igual a 147,2 mg-S/L, a velocidade de consumo foi de 3,36 mg-S/L.h. A porcentagem de remoção de sulfeto foi de 98,2%.

Nota-se que os dados obtidos, em relação à porcentagem de remoção de sulfeto, para os reatores com concentração inicial de sulfeto de 147,2mg-S/L foram

semelhantes aos obtidos para concentração inicial de sulfeto de 11,4mg-S/L. No entanto, é importante ressaltar que, apesar das semelhanças dos resultados obtidos, as velocidades foram bem distintas.

Para concentração inicial de sulfeto de 380,8 mg-S/L a velocidade de consumo foi de 2,02 mg-S/L.h, como demonstrado nas Tabela 11, Figura 14, e Tabela 13.

No ensaio com concentração inicial de sulfeto de 529,6 mg-S/L, praticamente não houve consumo, com porcentagem de remoção igual a 10,8%. Este fato indicou inviabilidade do processo de remoção, possivelmente devida à inibição da cultura de sulfobactérias verdes por alta concentração de sulfeto. Nesses reatores foi observado ligeiro acréscimo de sulfeto em 81,5 horas. O acréscimo de sulfeto foi relacionado com a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS). Esse aspecto foi confirmado pela microscopia óptica, onde foram visualizadas células semelhantes a *Desulfovibrio*.

Provavelmente, nesse caso onde foram visualizadas as BRS, a alta concentração de sulfeto presente nesses reatores inibiu o desenvolvimento das sulfobactérias verdes, e dessa forma, o crescimento das BRS foi favorecido. Essas bactérias, possivelmente utilizaram a pequena porcentagem de sulfato proveniente da oxidação de sulfeto, e o dióxido de carbono disponível no meio para a redução desse sulfato.

VARESCHE (1997) realizou ensaios de consumo de sulfeto com cultura pura de *Chromatium* sp. em reatores em batelada com iluminação através de duas lâmpadas fluorescentes. A cultura foi isolada de amostra proveniente de reator UASB, alimentado com glicose. O referido autor observou que para concentração inicial de 64 mg-S/L de sulfeto a porcentagem de remoção foi de 98,5% em 46 horas de operação. Para concentração inicial de 383,4 mg-S/L de sulfeto a porcentagem de remoção foi de 69,1% em 230 horas de operação.

No presente trabalho, com sulfobactérias fototróficas verdes, para concentração de 380,8 mg-S/L a porcentagem de remoção foi de 73,1% em 138,0 horas. Este fato, certamente indicou melhor eficiência no processo de remoção de sulfeto.

No entanto, para concentração inicial igual a 529,6 mg-S/L, verificou-se que o efeito de toxicidade exercido pelo sulfeto às sulfobactérias fototróficas verdes foi determinante na relação da avaliação do consumo desse composto nesses reatores. No estudo com *Chromatium* sp. VARESCHE (1997), verificou que para concentração inicial igual a 16,44mM (526,08 mg-S/) houve, também, inibição no crescimento da cultura, nesse caso, a porcentagem de remoção foi de 60,0%, com 338 horas de operação.

Dessa forma, neste trabalho, as eficiências de utilização de sulfeto nos reatores em batelada tiveram como fator essencial às características fisiológicas de *Chlorobium*, condições do inóculo e fatores abióticos co-relacionados, como por exemplo a concentração da fonte de sulfeto.

Nesse sentido, segundo BAYLE & OLLIS, (1986) e FORESTI *et al.*, (1999), muitos fatores podem influenciar o comportamento dos microrganismos, em reatores em batelada, como por exemplo, “idade” do inóculo, composição do meio, pH, temperatura e presença de compostos tóxicos.

Os ensaios com as concentrações iniciais de sulfeto iguais a 11,4 e 40,5 mg-S/L foram repetidos devido à variações observadas nas concentrações iniciais de proteína. Após a realização dos primeiros ensaios com essas concentrações de sulfeto o lodo de inóculo manteve-se armazenado em geladeira por, aproximadamente, 8 meses. Após esse período é que os ensaios foram repetidos.

O fato de o lodo ter sido mantido em geladeira por período excessivamente longo deve ter contribuído para a inativação dos microrganismos presentes no lodo, de forma que quando o ensaio foi repetido, o restabelecimento das atividades normais de consumo de sulfeto deve ter sido mais lento do que quando o lodo estava em atividade.

Tal observação foi comprovada através dos dados obtidos para o ensaio com a concentração inicial de sulfeto de 40,5 mg-S/L, em que este foi consumido após 72,5 horas. Comparando este valor com o do ensaio para a concentração de 147,2 mg-S/L (tempo de consumo igual a 43 h) observa-se que houve considerável aumento no tempo de consumo quando a concentração de sulfeto foi menor, diferentemente do comportamento que era esperado.

Comparando os resultados obtidos para as concentrações de sulfeto de 11,4 e 147,2 mg-S/L, observa-se que os tempos de remoção de sulfeto foram de 37,5 h e 43 h, respectivamente. De forma semelhante, era esperado que para a menor concentração de sulfeto, também fosse menor o tempo de consumo. No entanto, o tempo para seu consumo foi apenas 13% menor do que o tempo necessário para consumir 147,2 mg-S/L.

No entanto, justificativas e discussões importantes poderiam se alicerçar, também, em fatores abióticos, como por exemplo, a presença de compostos tóxicos.

Em relação à presença desses compostos, relacionada ao crescimento de culturas em reatores em batelada, é importante, primeiramente definir e diferenciar os conceitos de toxicidade e inibição. A toxicidade está relacionada ao efeito adverso (não necessariamente letal) no metabolismo bacteriano. A inibição causa prejuízo às funções fisiológicas dos microrganismos.

Nesse sentido, considerando o efeito da toxicidade do composto no crescimento e no metabolismo bacteriano, este pode ser abordado em dois aspectos: (1) a quantidade de determinado composto tóxico, e (2) a concentração de microrganismos em um meio contendo esse determinado composto tóxico (SPEECE, 1996).

Nesse sentido, quando compostos tóxicos estão presentes em processos de tratamento anaeróbios, os microrganismos são, geralmente, capazes de degradar tais compostos. No entanto, é necessária uma fase de adaptação desses microrganismos em relação à toxicidade exercida por esses compostos. A adaptação dos microrganismos pode ser realizada, por exemplo, expondo a biomassa a, primeiramente, relativa baixa concentração dos compostos tóxicos. Dessa forma, a adaptação gradativa da biomassa irá permitir seu desenvolvimento, mesmo sob condições desfavoráveis (SPEECE, 1996).

Em relação ao sulfeto, a presença deste composto em reatores anaeróbios geralmente resulta em problemas operacionais desses reatores, já que o sulfeto exerce efeito tóxico para a maioria dos microrganismos, assim como para o ser humano.

O efeito relacionado à toxicidade do sulfeto depende, diretamente, do pH do meio, assim, em pH alcalino, o efeito de inibição do sulfeto é maior quando comparado com seu efeito em pH neutro e ácido (SPEECE, 1996). No caso dos ensaios realizados em reatores em batelada, neste trabalho, o pH foi mantido a 6,7.

No entanto, apesar de sua toxicidade, como já abordado, o sulfeto exerce papel importante, no metabolismo oxidativo de determinados microrganismos, alguns, por exemplo, utilizam compostos de enxofre como única fonte de elétrons (KAPPLER & DAHL, 2001).

Dessa forma, a adaptação de determinados microrganismos em relação à presença ou até a diferentes concentrações de sulfeto, está diretamente relacionada com a evolução desses microrganismos. Isto é, à seleção de determinados nichos ecológicos adaptáveis a possíveis ambientes inóspitos, como por exemplo, onde estão presentes compostos tóxicos.

Ecologicamente, esses microrganismos em seus habitats estão, comumente, em equilíbrio dinâmico relacionado ao *input* e *output* de nutrientes.

Contudo, em sistemas de tratamento, ou em diversos processos biotecnológicos os microrganismos são submetidos a elevadas cargas de compostos tóxicos, o que pode acarretar inviabilidade do processo, mesmo para os microrganismos que dependem, fisiologicamente, desses compostos.

Essa consideração foi relevante quando se verificou (Tabela 13) a relativa baixa eficiência, ou baixo consumo de sulfeto, nos reatores alimentados com concentração inicial de 380,8mg-S/L. Mais acentuadamente, quando se verificou, ainda, a inibição exercida pelo sulfeto nos reatores alimentados com concentração inicial de 529,6mg-S/L.

5.3 Cinética de Crescimento de Sulfobactérias fototróficas verdes

Nesta parte serão consideradas as análises das concentrações de sulfeto total, proteína total e enxofre elementar, realizadas em função do tempo, ao longo dos ensaios em reatores em batelada; considerando como referência as diferentes concentrações iniciais de sulfeto (mg/L) e o crescimento microbiano (biomassa).

Uma característica importante que deve ser justificada no estudo das bactérias fototróficas anoxigênicas é a quantificação do crescimento celular. Entre as técnicas disponíveis para o acompanhamento do crescimento celular, optou-se pela determinação de proteína total, como justificado anteriormente, segundo o método de LOWRY (1951), modificado por PETERSON (1977); utilizando o método de rompimento com acetona e SDS (BHADURI & DEMCHICK, 1983).

A partir da análise das Tabelas 7 a 12 e das Figuras 10 a 15, pode-se ressaltar que, as diferentes concentrações de sulfeto exerceram comportamentos distintos em relação ao crescimento (rendimento) celular e ao metabolismo (consumo/produção) de enxofre elementar.

Para melhor ilustração dos resultados, a Tabela 14 apresenta os valores médios de concentrações inicial e máxima de proteína total em função do tempo e das concentrações iniciais de sulfeto. A Tabela 15 apresenta os valores médios de concentrações inicial e máxima de enxofre elementar em função do tempo e das concentrações iniciais de sulfeto, durante o crescimento de sulfobactéria verde nos reatores em batelada.

Tabela 14: Valores médios de concentrações inicial e máxima de proteína total em função do tempo e das concentrações iniciais de sulfeto nos reatores em batelada.

Concentração inicial de sulfeto total (mg-S/L)	Concentração inicial de proteína total (mg-SAB/L)	Valor máximo de proteína total (mg-SAB/L)	Tempo (h)
11,4	23,9	51,4	21,5
40,5	24,2	68,1	50,5
147,2	27,7	94,8	117,0
262,4	30,5	108,4	91,0
380,8	25,3	50,3	49,0
529,6	31,2	49,8	178,5

Tabela 15: Valores médios de concentrações inicial e máxima de enxofre elementar em função do tempo e das concentrações iniciais de sulfeto nos reatores em batelada.

Concentração inicial de sulfeto total (mg-S/L)	Concentração inicial de enxofre extracelular (mg-S/L)	Valor máximo de enxofre extracelular (mg-S/L)	Tempo (h)
11,4	4,4	12,9	37,5
40,5	21,1	38,5	50,5
147,2	36,8	62,4	117,0
262,4	50,0	117,1	54,0
380,8	59,3	99,9	85,0
529,6	30,3	72,6	226,0

Nos reatores com concentração inicial de sulfeto igual a 11,4mg/L, ao final da fase exponencial de crescimento, com 21,5 horas, e concentração máxima de proteína total igual a 51,4 mg/L, praticamente todo sulfeto disponível no meio havia sido utilizado. Ainda, a produção de enxofre elementar foi acentuada durante o período inicial até 37,5 horas de operação. É interessante ressaltar que, após esse período, enxofre elementar passou a ser utilizado, possivelmente para manutenção da cultura. Segundo PFENNIG (1989), esses microrganismos são também capazes de utilizar esse composto.

Nos reatores alimentados com concentração inicial de sulfeto de 40,5mg-S/L, o valor máximo de proteína total correspondeu a 68,1 mg/L, em 50,5 horas. Nesse mesmo período, elevada porcentagem de sulfeto havia sido consumida pela cultura enriquecida. O valor inicial de enxofre foi de aproximadamente 21,1mg/L, e com ligeiro decréscimo após 3 horas de operação. No entanto, nas 47 horas posteriores, enxofre elementar foi produzido, paralelamente ao consumo de sulfeto nesse mesmo período. Nesse ensaio, consumo expressivo de enxofre extracelular não foi constatado.

Os ensaios com concentrações iniciais de sulfeto de 147,2 e 262,4mg-S/L, respectivamente, mostraram comportamentos relativamente semelhantes. O crescimento celular ocorreu mais vigorosamente ao término de sulfeto total; atingindo a concentração máxima de proteína total de 94,9 e 108,4 mg/L em 117 e 91 horas, respectivamente. Nestes ensaios as concentrações iniciais de enxofre foram de 36,8 e 50,0 mg/L, atingindo valores máximos de 62,4 e 117,1 mg/L, após 117 e 54 horas, respectivamente.

Notadamente para os reatores com 147,2 mg-S/L, constatou-se crescimento da sulfobactéria verde após o término de sulfeto presente no meio. Segundo SPEECE (1996), inúmeras espécies de microrganismos relacionados com processos anaeróbios são capazes de manter suas atividades metabólicas mesmo em períodos de ausência de substrato, esse fato se justifica, provavelmente, pelo baixo rendimento (metabolismo) celular nos processos anaeróbios.

Para os reatores com concentração inicial de sulfeto de 380,8mg-S/L, o crescimento celular foi relativamente menor em relação aos ensaios anteriormente analisados. O valor máximo de proteína correspondeu a 50,3mg/L em 49 horas de operação. No entanto nesse período, havia ainda, relativamente elevada porcentagem de sulfeto disponível para utilização pela cultura enriquecida. A concentração inicial de enxofre elementar foi de 59,3mg/L, e o valor máximo desse composto correspondeu a 99,9mg/L em 85 horas. No entanto, não foi verificado consumo (ou elevada variação) de enxofre elementar pela cultura enriquecida.

No ensaio com concentração inicial de sulfeto de 529,6 mg-S/L, praticamente não houve consumo de sulfeto, indicando inviabilidade do processo de remoção. Praticamente, também, não houve crescimento celular, possivelmente devida a inibição por alta concentração de sulfeto. Enxofre elementar foi produzido e utilizado para a manutenção celular, mesmo na presença de elevada concentração de sulfeto, correspondendo a 470,4 mg/L. Nesses reatores, também foi observado ligeiro acréscimo de sulfeto (481,6 mg-S/L) em 81,5 horas. É importante ressaltar, e como já argumentado, que nesses reatores foi constatada a presença de *Desulfovibrio*.

Pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos que o aumento do efeito inibidor decorrente da presença de sulfeto no meio de cultura tornou-se notório

através da verificação de progressivo aumento do tempo necessário para o consumo de sulfeto presente no meio, assim como através da verificação de relativo aumento para a obtenção dos valores máximos de proteína total e enxofre elementar, como demonstrado nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

E interessante ressaltar que, em todos os ensaios, a concentração inicial de proteína total variou na faixa de 23,9 a 31,2 mg-SAB/L. Estes valores foram essenciais para a determinação das velocidades específicas na fase exponencial de crescimento (μ). Através do cálculo da regressão linear dos pares de pontos, que corresponderam à fase exponencial de crescimento da biomassa, determinou-se a equação da reta, cujo coeficiente angular correspondeu ao μ .

Ainda, a determinação de μ permitiu o cálculo do tempo de geração (T_g) da cultura, que correspondeu ao tempo necessário para que a célula se dividisse, ou para que a população se duplicasse, como demonstrado através da Equação 5.

A Tabela 16 apresenta os valores de μ e do tempo de geração para cada concentração inicial de sulfeto, correspondendo aos diferentes ensaios. As Figuras 16 e 17 apresentam, respectivamente, a variação da velocidade específica de crescimento de microrganismos em relação ao consumo de sulfeto, e a variação do tempo de geração em relação às concentrações iniciais de sulfeto.

Como pode ser observado, para concentração inicial de sulfeto igual a 11,4 mg-S/L a velocidade específica de crescimento obtida foi $0,0346\text{h}^{-1}$. Os valores da velocidade específica de crescimento para as concentrações de sulfeto iguais a 147,5 e 262,4 mg-S/L foram, relativamente, muito menores, correspondendo a $0,0091\text{h}^{-1}$ e $0,0087\text{h}^{-1}$, respectivamente. Para as concentrações iniciais de sulfeto iguais a 380,8 e 529,6 mg-S/L, notou-se, a partir dos baixos valores de μ , inibição do crescimento dos microrganismos. Provavelmente, essa inibição ocorreu por elevada concentração de sulfeto presente no meio. Nesses ensaios as velocidades específicas de crescimento foram iguais a $0,0026\text{h}^{-1}$ e $0,0035\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Dessa forma, em relação às concentrações iniciais de sulfeto, houve relativamente elevada queda na velocidade de crescimento, a partir do ensaio com concentração inicial de sulfeto de 40,5mg-S/L, sendo que esta queda se manteve, também, para os demais ensaios.

Tabela 16: Valores da velocidade específica de crescimento (μ) e do tempo de geração para as concentrações iniciais de sulfeto, durante o crescimento de sulfobactéria verde nos reatores em batelada.

Concentração inicial de sulfeto total (mg-S/L)	Velocidade específica de crescimento (h ⁻¹)	R ²	Tempo de Geração (h)
11,4	0,0346	0,994	19,98
40,5	0,0270	0,992	25,66
147,5	0,0091	0,978	75,67
262,4	0,0087	0,997	79,12
380,8	0,0026	0,980	265,57
529,6	0,0035	0,982	199,18

Figura 17: Variação da velocidade específica de crescimento de microrganismos em relação ao consumo de sulfeto.

É interessante ressaltar que o valor da velocidade específica de crescimento obtido para concentração inicial de sulfeto igual a 529,6 mg-S/L foi ligeiramente maior que o obtido para concentração de sulfeto igual a 380,8 mg-S/L. No entanto, nos reatores com maior concentração de sulfeto, mostrado na Tabela 12 e Figura 15, não foi constatada crescimento significativo da biomassa. Dessa forma os métodos aplicados para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento nesse ensaio, provavelmente, podem não ser conclusivos em relação aos parâmetros obtidos para os demais ensaios.

VARESCHE (1997), no estudo da avaliação da cinética de crescimento de *Chromatium* sp sob condições fotoautotróficas, verificou diminuição na velocidade de $0,0436 \text{ h}^{-1}$ para $0,0089 \text{ h}^{-1}$ com o aumento da concentração inicial de sulfeto de 2,01 mM (64,32 mg-S/L) para 16,44 mM (526,08 mg-S/L), respectivamente. O tempo de geração apresentou comportamento crescente com valores iguais a 15,9 h e 77,6 h, respectivamente. Para concentração inicial de sulfeto igual a 11,98mM (383,36 mg-S/L) o referido autor verificou que o valor da velocidade específica de crescimento foi de $0,0114 \text{ h}^{-1}$, e o tempo de geração 60,8 horas.

No presente trabalho, para concentração inicial de sulfeto igual a 380,8 mg-S/L, o valor da velocidade específica de crescimento foi de $0,0026 \text{ h}^{-1}$, com tempo de geração de 265,57 horas. Dessa forma, nota-se que para a sulfubactéria verde a referida concentração de sulfeto exerceu maior toxicidade quando comparado com a cultura de *Chromatium* sp. no trabalho de VARESCHE (1997). Possivelmente, esses valores indicaram uma cultura anaeróbia estrita levando a produção de reduzida massa celular.

Neste trabalho, notou-se ainda, que o tempo de geração da sulfubactérias fototróficas verdes aumentou gradativamente em relação às concentrações iniciais de sulfeto, demonstrando, possivelmente, inibição pelo substrato (sulfeto).

Figura 18: Variação do tempo de geração (Tg) em relação às concentrações iniciais de sulfeto (mg-S/L).

Em comparação com as bactérias sulfúreas púrpuras, as bactérias verdes são fisiologicamente mais restritas que as primeiras. Todas as espécies dependem de compostos reduzidos de enxofre e incorporam substratos orgânicos, na maioria das vezes, somente o acetato, em proporções limitadas ao doador de elétrons (sulfeto ou tiosulfato). Ainda, em contraste com a maioria das bactérias púrpuras, as bactérias verdes são incapazes de mover-se e não apresentam foto- ou quimiotaxia em relação às melhores condições de crescimento.

Em relação ao crescimento, BIEBL & PFENNIG (1978) demonstraram em experimentos com culturas puras de *Chlorobium* maior rendimento celular na presença de composto orgânico (acetato), do que somente na presença de CO₂ como fonte de carbono. Especificamente neste estudo, com cultura enriquecida de sulfobactérias fototróficas verdes, não foi adicionada fonte orgânica de carbono. O carbono disponível encontrava-se apenas no CO₂ da mistura gasosa e no bicarbonato de sódio.

Os resultados obtidos por KIM *et al.* (1992), para células de *Chlorobium thiosulfatophilum*, mostraram relativa inibição do crescimento celular, em relação à velocidade específica de crescimento, pela presença de sulfeto em concentrações de 5,4mM (172,8 mg-S/L). Esses dados estão de acordo com os parâmetros obtidos no presente trabalho. Como demonstrado, para concentrações de sulfeto acima de 147,2 mg-S/L, correspondendo a aproximadamente 4,6mM, ocorreu inibição do crescimento celular, onde os valores da velocidade específica de crescimento (μ) e do tempo de geração (T_g) foram, respectivamente, iguais a $0,00916h^{-1}$ e 75,67h.

A partir do cálculo das velocidades de crescimento, foi possível, calcular o coeficiente de conversão relativo ao crescimento de microrganismos em relação ao sulfeto consumido ($Y_{x/s}$), a partir da Equação 6.

A Tabela 17 apresenta os valores dos coeficientes de conversão e das velocidades e crescimento em relação às diferentes concentrações iniciais de sulfeto. As Figuras 18 e 19 apresentam, respectivamente, a variação do coeficiente de conversão de sulfeto relativo ao crescimento de microrganismos, como função da concentração inicial de sulfeto nos ensaios em reatores em batelada; e o efeito da velocidade de manutenção celular sobre o coeficiente de conversão substrato/microrganismo.

Como pode ser observado na Tabela 17, ocorreu progressiva diminuição na taxa de crescimento de microrganismos em relação ao sulfeto consumido com o aumento da concentração inicial de sulfeto. Quando a concentração aumentou de 11,4 para 40,5 mg-S/L, o coeficiente de conversão sulfeto/microrganismo diminuiu de 3,29 para 1,78 mg-SAB/L/mg-S/L, ou seja, queda de 45,8%. O efeito das concentrações iniciais de sulfeto presente no meio de cultura sobre o crescimento dos microrganismos foi melhor ilustrado à partir da observação do intervalo entre 11,4 e 529,6mg-S/L, onde o coeficiente de conversão sulfeto/microrganismo diminuiu vigorosamente, ressaltando, o efeito inibidor, relativamente forte, do sulfeto para o crescimento da cultura.

Tabela 17: Valores dos coeficientes de conversão e das velocidades de crescimento em relação às diferentes concentrações iniciais de sulfeto nos reatores em batelada.

Concentração inicial de sulfeto total (mg-S/L)	Coefficiente de conversão $Y_{x/s}$	$1/Y_{x/s}$	Velocidade de crescimento (μ)	$1/\mu$
11,4	3,29	0,30	0,0347	28,82
40,5	1,78	0,56	0,027	37,04
147,2	0,14	7,14	0,0092	108,70
262,4	0,25	4,00	0,0088	113,64
380,8	0,034	29,41	0,0026	384,62
529,6	0,067	14,93	0,0035	285,71

Figura 19: Variação do coeficiente de conversão de sulfeto relativo ao crescimento de microrganismos, como função da concentração inicial de sulfeto nos reatores em batelada.

Figura 20: Efeito da velocidade de manutenção celular sobre o coeficiente de conversão substrato/microrganismo.

Dessa forma, como pode ser constatado na Figura 18, e analisado na Tabela 17, o coeficiente de conversão $Y_{x/s}$ diminui progressivamente com o aumento da concentração inicial de sulfeto, sendo esta queda mais acentuada no intervalo de concentrações de 40,5 a 147,2mg-S/L, indicando, provavelmente, o início da atuação de efeito inibidor do sulfeto no crescimento da cultura enriquecida. Para concentrações superiores a 380,8mg-S/L, notadamente, a inibição pelos níveis de sulfeto foi fortemente pronunciada, e, conseqüentemente, os valores do coeficiente de conversão ($Y_{x/s}$) diminuiram vigorosamente.

Considerando essa acentuada queda no coeficiente de conversão com aumento das concentrações iniciais de sulfeto, uma possível explicação para tal evento pode ser feita através do gráfico de PIRT (1965)⁶ apud VARESCHE (1997). Os valores de $1/Y_{x/s}$ e $1/\mu$ apresentados na Tabela 17 correspondem ao modelo de conversão que considera o consumo de substrato para a manutenção das células. Esse

⁶ PIRT, S.J. The Maintenance Energy of Bactéria in Growing Cultures. Proc. Royal Soc. – B, 163: 224-231, 1965

modelo elucidado por PIRT (1965), está representado pela Equação 7. A Figura 19, apresenta o cálculo do coeficiente de manutenção para a cultura de sulfobactérias fototróficas verdes em crescimento.

Segundo o referido autor, o coeficiente angular da equação linear ajustada corresponde à velocidade específica de consumo de substrato para funções de manutenção celular (m), o qual no caso deste estudo correspondeu ao valor igual a $0,0758 \text{ h}^{-1}$. Dessa forma, e com referência no decaimento nos valores do coeficiente de conversão ($Y_{x/s}$), pode-se sugerir que grande parte da energia obtida através do consumo de substrato foi direcionada para manutenção.

O valor $1/Y_g$ representa a parcela de substrato consumida que é revertida apenas para o crescimento, como demonstrado na Equação 7, no presente estudo esse valor foi de aproximadamente $-0,37$, indicando, valor tendendo a zero, isto é, onde não há crescimento da biomassa.

VARESCHE (1997), no estudo da avaliação da cinética de crescimento de *Chromatium* sp, verificou diminuição nos valores do coeficiente de conversão $Y_{x/s}$ com o aumento da concentração inicial de sulfeto. No estudo do referido autor, quando a concentração inicial de sulfeto aumentou de $2,01 \text{ mM}$ ($64,32 \text{ mg-S/L}$) para $4,01 \text{ mM}$ ($128,32 \text{ mg-S/L}$) o coeficiente de conversão sulfeto/microrganismo diminuiu de $10,287$ para $7,019 \text{ mg/L/mM}$, ou seja uma queda de $31,8\%$. Ao longo do intervalo de concentração de $2,01$ a $16,44 \text{ mM}$ ($526,08 \text{ mg-S/L}$) o fator de conversão sulfeto/microrganismo diminuiu $3,4$ vezes, verificando-se, também nesse estudo, o efeito inibidor do sulfeto para o crescimento da cultura de *Chromatium* sp. Nesse mesmo estudo, o referido autor, constatou que a velocidade específica de consumo de substrato para funções de manutenção celular (m) foi igual a $0,0019 \text{ h}^{-1}$.

5.4 Caracterização Microbiana

Os resultados e discussões apresentados neste item referem-se às análises de PCR-DGGE realizadas com as amostras de cultura enriquecida de sulfobactérias fototróficas verdes, coletadas durante os ensaios em reatores em batelada com diferentes concentrações de sulfeto.

Neste trabalho, para a caracterização microbiana, é importante ressaltar que as amostras foram coletadas na fase exponencial de crescimento, considerando como referência as medições do consumo (utilização) de sulfeto, durante os experimentos.

O objetivo maior foi promover a comparação e a avaliação das populações de sulfubactérias fototróficas verdes, verificando possíveis alterações em função do aumento das concentrações iniciais de sulfeto nos ensaios realizados.

Os resultados da análise do PCR-DGGE podem ser melhor elucidados à partir da observação da Figura 20, que mostra o gel de DGGE das amostras dos cinco reatores com diferentes concentrações de sulfeto.

É importante ressaltar que as amostras de populações microbianas provenientes dos ensaios em reatores em batelada com concentração inicial de sulfeto de 529,6mg-S/L não estão apresentadas na Figura 20. A extração dessas bandas não foi possível de se realizar, provavelmente devido ao baixo rendimento de biomassa nesses reatores, relacionada com a elevada concentração inicial de sulfeto.

Dessa forma, a partir da análise das bandas apresentadas na figura 20, verificou-se que na avaliação da estrutura das populações de sulfubactérias fototróficas verdes, elevada similaridade de bandas, ou seja, mesmo padrão de bandas foi constatado. Este fato sugeriu que não houve variações relevantes na estrutura das populações microbianas.

Esses resultados, podem sugerir que houve elevada seletividade do meio de cultura relacionada ao enriquecimento das sulfubactérias fototróficas verdes, como demonstrado na Figura 9.

Assim, mesmo quando se considera o efeito de inibição exercido pela presença de sulfeto no meio de cultura, como argumentado em discussões anteriores, essas bactérias, provavelmente já estavam adaptadas (ou selecionadas) ao meio com concentração de aproximadamente 320 mg-S/L nos ensaios de enriquecimento.

Figura 21: Visualização das bandas no gel de DGGE (com concentrações de 35 – 55% de gel desnaturante) das amostras dos reatores com diferentes concentrações iniciais de sulfeto e controles para comparação das bandas correspondentes às bactérias fototróficas.

Legenda: *Pseud.* – *Pseudomonas* sp. (Controle positivo); *All.* – *Allochroematium vinosum* (Controle positivo); *C.E.* – Cultura Enriquecida (sulfobactérias fototróficas verdes); *R1* – Amostras de populações microbianas dos reatores com 11,4mg-S/L; *R2* - Amostras de populações microbianas dos reatores com 40,5mg-S/L; *R3* - Amostras de populações microbianas dos reatores com 147,2 mg-S/L; *R4* - Amostras de populações microbianas dos reatores com 262,4 mg-S/L; *R5* - Amostras de populações microbianas dos reatores com 380,8 mg-S/L;

Nesse aspecto, observou-se que o mesmo padrão de bandas foi constatado para a cultura enriquecida (*C.E.*) e para as amostras dos ensaios em reatores com diferentes concentrações de sulfeto (*R1*, *R2*, *R3*, *R4* e *R5*). Tais resultados confirmaram a caracterização microbiana através da visualização por microscopia óptica, na qual foi observado predomínio de apenas um tipo morfológico, com células semelhantes a *Chlorobium*.

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

1) A técnica de enriquecimento em Coluna de Winogradsky foi adequada para a obtenção das populações de sulfobactérias fototróficas verdes.

2) O meio de cultura foi seletivo para obtenção de cultura de sulfobactérias fototróficas verdes semelhantes à *Chlorobium*.

3) Nos reatores em batelada com concentrações iniciais de sulfeto iguais a 11,4 mg-S/L e 380,8 mg-S/L, a porcentagem de remoção foi de 98,2% e 73,1% em 37,5 h e 102,4 h, respectivamente.

4) Para concentração inicial de 529,6 mg-S/L praticamente não houve consumo de sulfeto.

5) Na avaliação cinética de crescimento da cultura enriquecida de sulfobactérias fototróficas verdes, foi verificada diminuição na velocidade de crescimento de $0,0346 \text{ h}^{-1}$ para $0,0035 \text{ h}^{-1}$ com o aumento da concentração inicial de sulfeto de 11,4 para 529,6 mg-S/L, respectivamente. O tempo de geração apresentou comportamento crescente com valores iguais a 19,98 h e 119,18 h, respectivamente.

6) Os valores do coeficiente de conversão de sulfeto relativo ao crescimento de microrganismos ($Y_{x/s}$), em função da concentração inicial de sulfeto nos ensaios em reatores em batelada, apresentaram diminuição progressiva com o aumento da concentração inicial de sulfeto, sendo esta queda mais acentuada no intervalo de concentrações de 40,5 a 147,2 mg-S/L, indicando, provavelmente, o início da atuação de efeito inibidor do sulfeto no crescimento da cultura enriquecida. Para

concentrações superiores a 380,8mg-S/L, a inibição pelos níveis de sulfeto foi fortemente pronunciada.

7) Na avaliação microbiana presente nos reatores com diferentes concentrações iniciais de sulfeto, foi constatado mesmo padrão de bandas em todos os ensaios realizados. Com exceção da concentração de 529,6 mg-S/L, onde não foi possível a extração do DNA das populações presentes nesses reatores.

7. RECOMENDAÇÕES

Em relação a estudos posteriores algumas recomendações podem ser sugeridas:

- 1) Avaliação da utilização de sulfeto e da cinética de crescimento de sulfobactérias fototróficas verdes sob condições fotomixotróficas;
- 2) Isolamento e sequenciamento de sulfobactérias fototróficas verdes, com estudos da avaliação das condições de crescimento em reatores em batelada;
- 3) Realização de ensaios em reatores em batelada com consórcio microbiano com bactérias fototróficas anoxigênicas e bactérias redutoras de sulfato.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-Target Nucleic Acid Probes for Studies in Microbial Ecology, *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 555-565, 2000.

AMESZ, JH.; KNAFF, D.B. Molecular Mechanisms of Bacterial Photosynthesis. In: *Biology of anaerobic microorganisms*. Edited by Alexander J.B. Zehnder, p.113-178, 1988.

BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F. I *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd Edition, McGraw-Hill, New York, 1986.

BAULD, J. Transformation of Sulfur Species by Phototrophic and Chemotrophic Microbes. *The Importance of Chemical "Speciation" in Environmental Processes*, Life Sciences Research Report 33, 762p, 1986.

BIEBL, H & PFENNIG, N. Growth Yields of Green Sulfur Bacteria in Mixed Cultures with Sulfur and Sulfate Reducing Bacteria. *Archives of Microbiology*, 117: 9-16, 1978.

BHADURI, S. & DEMCHICK, P.H. Simple and Rapid Method for Disruption of Bacteria for Protein Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 941-943, 1983.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, New Jersey, 909p, 1994.

CASAMAYOR, E.O.; SCHÄFER, H.; BAÑERAS, L.; PEDRÓS, C.; MUYZER, G. Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial

Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 499-508, 2000.

CATTONY, E.B.M. Avaliação da Diversidade Microbiana e das Características Físico-Químicas de Solo Submetido ao Cultivo de Cana-de-Açúcar. Dissertação de Mestrado do Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC – USP, 2001

CHARLTON, P.J.; McGRATH, J.E.; HARFOOT, C.G. (1997). The Winogradsky Plate, a Convenient and Efficient Method for the Enrichment of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 30: 161-163, 1997.

CHERNICHARO, C.A.L. *Reatores Anaeróbios – Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias (Vol. 5)* Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 1997.

COOPER, S. *Bacterial Growth and Division*. Academic Press, Inc., 501 p. 1991.

CORK, D.J.; GARUNAS, R.; SAJJAD, A. *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*; Biocatalyst in the Production of Sulfur and Organic Carbon from a Gas Stream Containing H₂S and CO₂. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 913-918, 1983.

ESTEVES, F.A. *Fundamentos de limnologia*. Editora Interciências, Rio de Janeiro, Segunda Edição, 1998.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P.F.F. Fundamentos do Tratamento Anaeróbio. In: *Tratamento de*

Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo.
Coordenador: José Roberto Campos, ABES, Rio de Janeiro, 1999.

FUHRMANN, S.; OVERMANN, J.; PFENNIG, N.; FISCHER, U. Influence of Vitamin B₁₂ and Light on the Formation of Chlorosomes in Green- and Brown-Colored *Chlorobium* Species. *Archives of Microbiology*, 160: 193-198, 1993.

HENSHAW, P.F. & ZHU, W. Biological Conversion of Hydrogen Sulphide to Elemental Sulphur in a Fixed-Film Continuous Flow Photo-Reactor. *Wat. Res.* Vol.35, No.15, pp. 3605-3610, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3233-3241, 1997.

HILTON, OLSZKIEWICZ, J.A. Sulfide-Induced Inhibition of Anaerobic Digestion. *Journal of Environmental Engineering*, 114: 1377-1391, 1988.

HOARE, D.S.; GIBSON, J. Photoassimilation of Acetate and the Biosynthesis of Amino Acids by *Chlorobium thiosulphatophilum*. *Biochemistry Journal*, 91: 546-559, 1964.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Anoxygenic Phototrophic Bacteria. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition, Williams & Wilkins, 1994.

JANSSEN, A.J.H.; LETTINGA, G.; KEIZER, A. 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*, 151, pp. 389-397, 1999.

JASPERS, E.; OVERMANN, J. Separation of Bacterial Cells by Isoelectric Focusing, a New Method for Analysis of Complex Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3176-3181, 1997.

JEONG G. & KIM B. The Influence of Light/Dark Cycle at Low Light Frequency on the Desulfurization by a Photosynthetic Microorganism, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87:481-488, 1999.

JOHNSON, J.R. Development of Polymerase Chain Reaction-Based Assay for Bacterial Gene Detection. *Journal of Microbiological Methods*. 41:201-209, 2000.

KAPPLER, U.; DAHL, C. Enzymology and Molecular Biology of Prokaryotic Sulfide Oxidation. *FEMS Microbiology Letters*, 2301, 1-9, 2001.

KIM ,B.W; CHANG, H.N; KIM, I.K; LEE, K.S Growth Kinetics of the Photosynthetic Bacterium *Chlorobium thiosulfatophilum* in a Fed-Batch Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.40, pp. 583-592, 1992.

KOBAYASHI, H.A., STENSTROM, M.; MARCH, R.A. Use of Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Sulfide Removal from Anaerobic Waste Treatment Effluent. *Water Res.* 17 (5), 579-587, 1982.

LENS,P.N.L.; LETTINGA, G.; VISSER,A.; JANSSEN, A.J.H.. Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wasterwaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technologic* 28 (1): 41 – 88, 1998.

LEVENSPIEL, O. *Chemical Reaction Engineering*. John Wiley & Son, Third Edition, 1999.

LIAAEN-JENSEN, S. Chemistry of Carotenoid Pigments. In: *The Photosynthetic Bacteria*. Edited by Roderick K. Clayton, p.233-245, 1978.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; LEWIS FARR, A. & RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275, 1951

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Biology Of Microorganisms*. 8º ed., New Jersey, Prentice Hall, 1997.

MADIGAN, M.T. Microbiology, Physiology, and Ecology of Phototrophic Bacteria. In *Biology of anaerobic microorganisms*. Edited by Alexander J.B. Zehnder, p.39-113, 1988.

MELVIN, A.N.W.T. & HOBSON, P.N. Identification of Anaerobic Digester Bacteria Using Polymerase Chain Reaction Methods. *Bioresource Technology*, 47:73-80, 1994

MUKHOPADHYAY, B.; JOHNSON, E.; ASCANO, M. Coditions for Vigorous Growth on Sulfide and Reactor-Scale Cultivation Protocols for the Thermophilic Green Sulfur Bacterium *Chlorobium tepium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:301-306, 1999.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. 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, 1993.

MUYZER, G.; RAMSING, N.B. Molecular Methods to Study the Organization of Microbial Communities. *Wat. Sci. Tech.* Vol.32, No8, pp.1-9, 1996.

NIELSEN, T.A.; LIU, W-T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D.A. Identification of a Novel Group of Bacteria in Sludge from a Deteriorated Biological Phosphorus Removal Reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1251-1258, 1999.

OPRIME, M.E.A.G. Processo Combinado Químico-Bacteriano para Remoção de H₂S de Gases Tese de Doutorado do Instituto de Química – UNESP - Araraquara, 2001.

OVERMANN, J. ;van GEMERDEN, H. Microbial Interactions Involving Sulfur Bacteria: Implications for the Ecology and Evolution of Bacterial Communities. *Microbiology Reviews*. 24: 591-599, 2000.

PASSAGLIA, L.M.P.; ZAHA, A. Técnicas de DNA Recombinante. In: *Biologia molecular Básica*. Coordenador: Arnaldo Zaha, 2º edição, 336p. Porto Alegre, Mercado Aberto, 2000.

PETERSON, G.L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowy *et al.* Which is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry*. V.83, p.346-356. 1977.

PFENNIG, N. General Physiology and Ecology of Photosynthetic Bacteria. In: *The Photosynthetic Bacteria*. Edited by Roderick K. Clayton, p.3-14, 1978.

PFENNIG, N. Anoxigenic Phototrophic Bacteria. II Green Bacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, Staley, J.T. et alii (eds), 2298p. 1989.

PFENNIG,N.; TRÜPER, H.G. Anoxigenic Phototrophic Bacteria. I. Purple Bacteria, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, volume 3 Staley, J.T. et alii (eds) 2298p., 1989.

PFENNIG, N. & WIDDEL, F. The Bacteria of the Sulphur Cycle. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 298, 433-441, 1982.

PLAS, C.; HARANT, H.; DANNER, H.; JELINEK, E.; WIMMER, K.; HOLUBAR, P.; BRAUN, R. Ratio of Biological and Chemical Oxidation During the Aerobic Elimination of Sulfide by Colourless Sulphur Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 817-822, 1992

PRANGE, A.; ARZBERGER, I.; ENGEMANN, C.; MODROW, H.; SCHUMANN, O.; TRÜPER, H.G.; STEUDEL, R.; DAHL, C.; HORMES, J. In Situ Analysis of Sulfur in the Sulfur Globules of Phototrophic Sulfur Bacteria by X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1428:446-454, 1999.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; ELSAS, J.D. *Molecular Microbial Ecology: a Minireview*. Revista de Microbiologia (28): 135-147, 1997.

SAKAMOTO, I.K. Comparação da Estrutura de comunidades Microbianas Complexas presentes em Sistemas de lodos Ativados Modificados para Remoção Biológica de Fósforo em Excesso, utilizando a Técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC – USP, 2001.

SÁNCHEZ, O.; van GEMERDEN, H.; MAS, J. Description of a Redox-Controlled Sulfidostat for the Growth of Sulfide-Oxidizing Phototrophs. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3640 – 3645, 1996.

SCHRANK, A.; SILVA, S.C. Síntese de RNA – Transcrição. In: *Biologia molecular Básica*. Coordenador: Arnaldo Zaha, 2º edição, 336p. Porto Alegre, Mercado Aberto, 2000.

SIREVAG, R. Photoassimilation of Acetate and Metabolism of Carbohydrate in *Chlorobium thiosulfatophilum*. *Archives of Microbiology*. 104: 105-111, 1975.

SOJKA, G.A. Metabolism of Nonaromatic organic Compounds .In: *The Photosynthetic Bacteria*. Edited by Roderick K. Clayton, p.707-716, 1978.

SOLOMON, E.P.; BERG, L.R.; MARTIN, D.W.; VILLEE, C. *Biology*. Third Edition, Saunders College Publishing, 1993.

SPEECE, R.E. Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters. Published by Archae Press, 1996.

STEENSGAARD, D.B.; van WALREE, C.A.; PERMENTIER, H.; BAÑERAS, L.; BORREGO, C.M.; GARCIA-GIL, J.; AARTSMA, T.J.; AMNESZ, J.; HOLZWARTH, A.R. Fast Energy Transfer Between BChl *d* and BChl *c* in Chlorosomes of the Green Sulfur Bacterium *Chlorobium limicola*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1457, 71-80, 2000.

STOLZ, J.F.; FULLER, R.C.; REDLINGER, T.F. Pigment-Protein Diversity in Chlorosomes of Green Phototrophic Bacteria. *Archives of Microbiology*. 154: 422-427, 1990.

TAKASHIMA, T.; NISHIKI, T.; KONISHI, Y. Anaerobic Oxidation of Dissolved Hydrogen Sulfide in Continuous Culture of the Phototrophic Bacterium *Prosthecochloris aestuarii*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 89: 247-251, 2000.

TRÜPER, H.G. Sulfur Metabolism .In: *The Photosynthetic Bacteria*. Edited by Roderick K. Clayton, p.677-687, 1978.

TRUPER, H.G. & PFENNIG, N. The Family Chlorobiaceae. In: *The Prokaryotes*. Edited by Albert Balows, Hans G. Truper, Martin Dworkin, Win Harder, Karl-Heinz Schleifer, p.3583-3592, Volume IV, Springer-Verlag, 1992.

TSAI, Y.; OLSON, B. H. Rapid Method for Direct Extraction of DNA from Soil and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, (57): 1070-1074, 1991.

van GEMERDEN, H. The Sulfide Affinity of Phototrophic Bacteria in Relation to the Location of Elemental Sulfur. *Archives of Microbiology*, 139: 289-294, 1984.

van GEMERDEN, H. Physiological Ecology of Purple and Green Bacteria. *Ann. Microbiology*. 134 B: 73-92, 1983.

van GEMERDEN, H.; BEEFTINK, H.H. Coexistence of *Chlorobium* and *Chromatium* in a Sulfide-Limited Continuous Culture. *Archives of Microbiology*. 129: 32-34, 1981.

VARESCHE, M.B.A. Estudo com Bactérias Fototróficas Anoxigênicas: Enriquecimento, Isolamento, Caracterização Nutricional e Cinética de Crescimento. Tese de Doutorado do Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC – USP, 1997.

WATANABE, K.; KADAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and Evaluation of PCR Primers to Amplify Bacterial 16S ribosomal DNA Fragments Used for Community Fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*. 44:253-262, 2001.

ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 316-322, 1996.

APÊNDICE 1

Curva Padrão do Sulfeto

APÊNDICE 2

Curva Padrão do Enxofre

APÊNDICE 3

Curva Padrão da Proteína