

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Helena Santiago Lima

**Monitoramento e validação de nitrificação
heterotrófica/desnitrificação aeróbica em isolados bacterianos
provenientes de estação de tratamento de efluentes**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2016

Helena Santiago Lima

**Monitoramento e validação de nitrificação
heterotrófica/desnitrificação aeróbica em isolados bacterianos
provenientes de estação de tratamento de efluentes**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa como parte
das exigências para a obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo. Modalidade: trabalho
científico.**

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva

Coorientadores: José Antônio Saraiva Grossi

Lívia Carneiro Fidélis da Silva

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2016

Helena Santiago Lima

**Monitoramento e validação de nitrificação
heterotrófica/desnitrificação aeróbica em isolados bacterianos
provenientes de estação de tratamento de efluentes**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa como parte
das exigências para a obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo. Modalidade: trabalho
científico.**

APROVADO: 20 de setembro de 2016

Prof^a. Cynthia Canêdo da Silva
(orientadora)
(UFV)

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa vencida. Agora mudam-se as metas e as expectativas para novas conquistas. Sei o quanto é importante as pessoas na nossa caminhada, não há profissional capaz de levar a vida isoladamente e é com essa certeza que agradeço a Deus e aqueles que me ajudaram a vencer essa etapa. À minha família, peça fundamental nessa caminhada, só tenho a agradecer. Mãe, obrigada pelo seu amor incondicional. Vó, você que viveu esse sonho comigo e hoje estamos realizando. Minha irmã Marina que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis. Meus sobrinhos, Laura e Murilo, que me fizeram querer ser uma pessoa melhor. Minha madrinha que sempre me ensinou o caminho. Ao meu padrasto Léo que é um exemplo a ser seguido. Aos meus tios e tias, primos e primas, meu muito obrigada! Aos meus amigos de São João, em especial a Laura e Albaline, vocês fazem parte da minha família. Aos meus amigos de curso Rosman, Otávio, Ana, Vanessa, Fernanda e João, sem vocês esses 5 anos não teriam sido a mesma coisa. Vivemos, sofremos e vencemos juntos! A Jana, Simôni e Thaisa, obrigada por ouvir, rir e chorar comigo. A galera do lab LIVM, onde passei muitos momentos divertidos, obrigada pelos ensinamentos. Tenho me espelhado em muitos de vocês. A Lívia, que é uma irmã que vou levar para o resto da vida! A minha orientadora Cynthia, obrigada pela oportunidade e apoio. Finalizo com a certeza de que o futuro dependerá só daquilo que tenho construído no presente.

RESUMO

A extração de petróleo em plataformas marinhas gera uma grande quantidade de efluente contaminado com compostos tóxicos e recalcitrantes. Grande volume de água é gasto no processo de extração do óleo, conseqüentemente grande volume de efluente é gerado. De acordo com as normas ambientais, o efluente, antes de ser reutilizado ou descartado, deve ser tratado. Dentre as formas de tratamento, o biológico por meio de Lodos Ativados tem sido o mais aplicado pelas indústrias, por apresentar baixo custo e boa eficiência de remoção de poluentes. A remoção biológica de amônia pode ser feita por microrganismos autotróficos que oxidam o nitrogênio amoniacal a nitrato passando por nitrito sob condições aeróbias, ou então, por meio de um processo que vem sendo muito observado em estações de tratamento de efluentes, onde um mesmo microrganismo heterotrófico realiza a nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbia simultaneamente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de remoção de amônia e monitorar a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia de seis isolados bacterianos provenientes de lodo ativado de estação de tratamento de efluentes de terminal de petróleo. Para isso foi realizado a extração do DNA dos isolados, seguido de sequenciamento e amplificação por PCR dos genes Nap = Nitrato redutase periplasmática; NarG= Nitrato redutase de membrana; NirS= Nitrito redutase para óxido nítrico (citocromo cd1 nitrito redutase); NirK= Nitrito redutase para óxido nítrico; NorB= Óxido nítrico redutase; NosZ= Óxido nitroso redutase; HaoF= Hidroxilamina a nitrito, que são genes que codificam para enzimas relacionadas com a nitrificação heterotrófica e desnitrificação aeróbica. Foi realizada a avaliação de remoção de amônia por teste colorimétrico e da produção do gás nitrogênio através de cromatografia gasosa. Os resultados mostraram que os seis micro-organismos possuíram a capacidade de realizar o processo de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbica, sendo assim promissores para utilização em estações de tratamento de efluentes.

ABSTRACT

Oil extraction in marine platforms generates a large amount of effluent contaminated with toxic and recalcitrant compounds. Large volume of water is spent in the oil extraction process, therefore large volumes of effluent is generated. In accordance with the environmental standards, the effluent before it is reused or discarded, should be treated. Among the forms of treatment, the biological through Activated Sludge has been the most used by industry, to present low cost and good pollutant removal efficiency. The biological removal of ammonia can be made by autotrophic microorganisms which oxidize the ammonia nitrogen to nitrate through nitrite under aerobic conditions, or else by a process which has been widely observed in wastewater treatment plants, where a same microorganism heterotrophic performs heterotrophic nitrification and aerobic denitrification simultaneously. The objective of this study was to evaluate the ammonia removal efficiency and monitor the heterotrophic nitrification/aerobic denitrification six bacterial isolates from activated sludge of oil terminal effluent treatment plant. To this was accomplished extraction of DNA isolates, followed by sequencing and PCR amplification of genes Nap = Nitrate reductase periplasmática; Narg = Nitrate reductase membrane; NIRS = nitrite reductase to nitric oxide (cytochrome cd1 nitrite reductase); NIRK = nitrite reductase to nitric oxide; Norb = nitric oxide reductase; NosZ = Nitrous oxide reductase; HaoF = hydroxylamine nitrite, which are genes encoding enzymes related to heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. Evaluating removal colorimetric assay for ammonia and the production of nitrogen gas by gas chromatography was conducted. The results showed that the six microorganisms possess the ability to perform the process of heterotrophic nitrification/denitrification aerobic, thus being promising for use in sewage treatment plants.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 12 |
| 2.1 Obtenção e cultivo dos isolados..... | 12 |
| 2.2 Extração do DNA..... | 13 |
| 2.3 Amplificação de genes relacionados com a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia..... | 13 |
| 2.4 Avaliação da eficiência de remoção de amônia..... | 15 |
| 2.5 Detecção de N ₂ e N ₂ O através de cromatografia gasosa..... | 16 |
| 2.6 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos..... | 17 |
| 2.8 Montagem dos contigs e análise taxonômica..... | 17 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 18 |
| 3.1 Avaliação da eficiência de remoção de amônia..... | 18 |
| 3.2 Avaliação da nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia através de cromatografia gasosa..... | 19 |
| 3.3 Amplificação de genes relacionados com a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia..... | 20 |
| 3.4 Identificação Taxonômica dos isolados bacterianos..... | 21 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 22 |
| 4. Referências Bibliográficas..... | 23 |

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é um dos principais países produtores de petróleo. Com isso há um grande impacto ambiental associado a essa atividade, uma vez que é gerado um grande volume de efluente com compostos recalcitrantes (ANP, 2015).

A água de produção gerada no processo de extração do petróleo é formada basicamente pela junção da água de formação, que está presente naturalmente nos reservatórios de petróleo, e a água de injeção, que é injetada acrescida de adjuvantes necessários para realizar a extração (Dan, 2001).

Para cada barril de petróleo extraído são gerados cerca de 246 a 340 litros de efluente que deve ser tratado. Essa água de produção tem uma composição complexa, contendo além de matéria orgânica, metais pesados, hidrocarbonetos, amônia e altos teores de sais (Osaka, 2008), que podem ser tóxicos para o meio ambiente quando descartados.

Portanto antes de ser descartada, a água de produção deve passar primeiramente por um tratamento até que atenda os padrões de exigências mínimas estabelecidos pela legislação ambiental vigente. A resolução do Conama 393/2007 especifica as condições e padrões permitidos para o descarte do efluente, para isso é necessário que seja realizado o tratamento do efluente, diminuindo assim o impacto causado pelo seu descarte no ambiente (Abou-Ellela et al., 2010).

Atualmente existem diferentes tecnologias aplicadas ao tratamento de efluentes, tais como floculação, flotação, lodos ativados, filtragem em membrana, entre outras. A escolha da tecnologia empregada varia de acordo com o tipo de efluente a ser tratado. No caso da água de produção gerada pelo processo de extração do petróleo o tratamento biológico por meio de lodos ativados tem sido mais utilizado, pois apresenta um menor custo operacional e uma alta eficiência de remoção de matéria orgânica e nutriente (Da Motta et al., 2003; Lefebvre e Moletta, 2006).

O processo de lodos ativados consiste basicamente na mistura, agitação e aeração do afluente junto ao lodo ativado no reator (tanque de aeração), seguido da separação do lodo do efluente tratado em uma etapa de decantação. Após separação do lodo ativado, este é retornado para o sistema, e o efluente tratado é recolhido e parte do lodo ativado, que é basicamente biomassa microbiana, é descartado quando em excesso (Figura 1) (Jordão & Pêsoa, 2005).

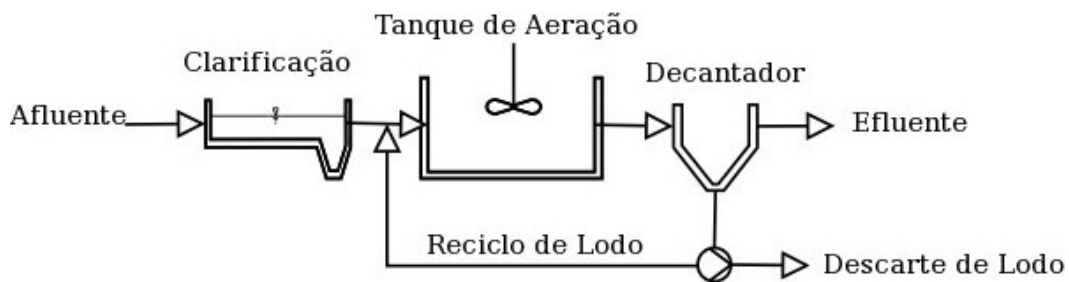


Figura 1. Esquema das unidades biológicas do sistema de lodos ativados.

Dentre os compostos tóxicos presentes na água de produção, o nitrogênio é um dos que possui grande importância. O despejo de efluente com altas cargas de nitrogênio nos corpos receptores pode causar eutrofização do meio, sendo prejudicial aos seres vivos e ao meio ambiente. A remoção biológica de nitrogênio consiste em diversas etapas realizadas por diferentes grupos de microrganismos que transformam o nitrogênio, na forma que se encontra no efluente, em nitrogênio gasoso (N_2).

O processo de remoção de nitrogênio é constituído por três etapas, amonificação, nitrificação e desnitrificação. A amonificação é uma etapa em que o nitrogênio orgânico é transformado em nitrogênio amoniacal. A nitrificação é uma etapa que pode ser realizada por espécies de bactérias e archaeas. Como requisitos para que ocorra é necessário que o ambiente esteja aeróbio e tenha a presença de nitrogênio amoniacal (Limpiyakorn, 2013). O processo de nitrificação consiste na passagem da amônia a nitrato sob condições aeróbias e é dividido em duas etapas. A primeira etapa consiste na oxidação

da amônia a nitrito, que pode ser realizada por bactérias dos gêneros *Nitrosococcus*, *Nitrosospira* e *Nitrosomonas* e por algumas espécies de arqueias pertencentes ao filo Thaumarchaeota (Uemoto e Saiki, 2000). Enquanto que a segunda consiste na oxidação de nitrito a nitrato por bactérias dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* (Oren, 2002).

Todos os grupos de micro-organismos nitrificantes descritos previamente são autotróficos, utilizam o CO₂ como fonte de carbono e amônia como fonte de energia, tais micro-organismos possuem um crescimento muito fastidioso (Souza, 2013).

A desnitrificação é a última etapa do processo de remoção de nitrogênio e consiste na transformação do nitrato, produto final da nitrificação, em gás nitrogênio (N₂). É um processo anóxico, onde na ausência de O₂, os micro-organismos utilizam o nitrato como acceptor final de elétrons (Vazoller et al., 2001). É um processo sequencial de redução dos compostos nitrogenados, conforme demonstrado pela reação a seguir:



Cada etapa é realizada por uma enzima distinta, redutase dissimilatória do nitrato (Nar), redutase do nitrito (Nir), redutase do óxido nítrico (Nor) e redutase do óxido nitroso (Nos), respectivamente. Diversos gêneros de bactérias já foram descritos como capazes de realizar a desnitrificação, como: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Hiphomicrobium*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas* e *Klebsiella* (Rittman & Langeland, 1985).

Entretanto, além da rota previamente descrita, existem mais duas vias metabólicas envolvidas nos processo de remoção de nitrogênio, ambos consistem um micro-organismos transformando amônia à nitrogênio gasoso e tais processos tem sido muito estudados em sistemas de tratamento de efluentes. A primeira foi descoberta na década de 90 e foi chamada de processo ANAMMOX (Woolard & Irvine, 1995) e a segunda descrita na década de 70, chamada nitrificação heterotrófica acoplada com a

desnitrificação aeróbia (Castignetti, 1984).

O processo ANAMMOX, observado primeiramente em sistemas anaeróbios de tratamento de efluentes, consiste na oxidação do íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso usando o nitrito como aceptor final de elétrons sob condições anaeróbias estritas (Woolard & Irvine, 1995). É um processo autotrófico, onde um dos subprodutos é o nitrato (NO_3^-), que representa cerca de 10% de todo o nitrogênio removido em um reator (Bonfá et al., 2013). Os gêneros já descritos como envolvidos no processo são *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* (Kartal et al., 2007) e *Candidatus Jettenia asiatica* (Quan et al., 2008).

O processo de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbica é realizado por bactérias heterotróficas, utilizando um substrato orgânico como fonte de carbono (Castignetti, 1984), assim o crescimento é mais rápido quando comparado as bactérias autotróficas envolvidas no processo de nitrificação convencional (Robertson e Kuenen, 1983). Entretanto, apesar de ser um processo conhecido há algum tempo, ainda pouco se conhece sobre seu metabolismo, como genes e rotas envolvidos neste processo. É um ponto importante, do ponto de vista biotecnológico, é que estas bactérias, nitrificantes heterotróficas, são capazes de realizar o processo de desnitrificação na presença de oxigênio, possibilitando a remoção completa de amônia em um mesmo reator (Third et al., 2005).

Assim, dada a importância dessas bactérias no processo de tratamento de efluentes, vários estudos têm caracterizado espécies capazes de realizar esse processo, tais como: *Alcaligenes faecalis* (Joo et al., 2005), *Bacillus* sp. (Yang et al., 2011), *Pseudomonas* sp. (Wan et al., 2011), *Pseudomonas stutzeri* (Zhang et al., 2011), *Bacillus methylotrophicus* (Zhang et al., 2012), *Acinetobacter* sp. (Yao et al., 2013), *Halomonas campisalis* (Guo et al., 2013) e *Aeromonas* sp. (Chen et al., 2014).

Assim, torna-se necessário ampliar os estudos a respeito dos microrganismos nitrificantes heterotróficos/desnitrificantes aeróbios para o melhor entendimento do processo e conseqüentemente possibilitar sua aplicação monitorada em sistemas de tratamento de efluentes que necessitam remover a amônia. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi monitorar a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia e a remoção de amônia em seis bactérias isoladas de lodo ativado de estação de tratamento de efluentes de terminal de petróleo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e cultivo dos isolados

Em experimentos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa Laboratório de Genética de Bactérias em colaboração com o Laboratório de Imunovirologia Molecular, ambos na UFV, Viçosa, MG, já havia isolado e selecionado seis bactérias (1.27, 1.35, 2.22, 2.23, 2.26 e 2V) de uma amostra de lodo ativado proveniente do sistema de tratamento de lodo ativados do Terminal Marítimo Almirante Barroso/TEBAR (São Sebastião/SP).

Os isolados foram cultivados em *Erlenmeyer* contendo 50 mL de meio HMN, específico para bactérias nitrificantes heterotróficas (composição do meio g/L) : 0.66 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.72 g de piruvato de sódio, 0.50 g de KH_2PO_4 , 0.50 g de Na_2HPO_4 , 0.20 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30.0 g de NaCl, 2.00 mL da Solução de elemento traço, pH 7.5. Solução Traço, g/L: 57.10 g de EDTA_2Na , 3.90 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.00 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.00 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5.00 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.10 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.60 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.60 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 6.0) (Zhang et al., 2012). Os mesmos foram mantidos sob incubação a 30°C, sob rotação de 150 rpm, sendo realizado o repique a cada 30 dias.

2.2 Extração do DNA

Foi realizada a extração de DNA de cada isolado de acordo com o protocolo proposto por Pospiech & Neumann (1995). Uma alíquota de 5 mL foi utilizada para obter um concentrado de células por centrifugação (10 minutos a 3.000 g) em tubos novos de 1,5 mL. O pellet foi ressuspendido em 500 µL de tampão SET (20 mM de Tris, 75 mM de NaCl e 25 mM de EDTA). Foi adicionado lisozima na concentração final de 1mg/mL e incubado a 37 °C por 30 minutos. Foi adicionado SDS 10% na proporção de 1/10 do volume e proteinase K na concentração final de 0,5 mg/mL, e posteriormente foi realizado a incubação por 1 hora. Foi adicionado NaCl 5 M na proporção de 1/3 do volume total. Foi adicionado 1 volume de clorofórmio e realizado a homogeneização por 30 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado por 10 minutos/17.900 xg e o sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo de 1,5 mL. O isopropanol foi adicionado na proporção de 1 volume e foi realizado a homogeneização ate a visualização do DNA. Para descarte do isopropanol foi realizado a centrifugação por 10 minutos a 17.900 xg e o pellet foi lavado com etanol 70% gelado e seco ao ar. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de água Mili-Q.

2.3 Amplificação de genes relacionados com a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia

Após a extração de DNA dos seis isolados, as amostras foram submetidas à amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) dos genes que codificam enzimas relacionadas com o processo de nitrificação e desnitrificação (Figura 2). As amplificações do DNA foram feitas em triplicata e um controle positivo que consiste no lodo bruto proveniente da estação de tratamento foi utilizado. Os pares de *primers* que foram utilizados na PCR estão dispostos na Tabela 1.

As reações foram realizadas para volume final de 50 µL, contendo 10 µL de tampão da enzima 5X, 3 µL MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de cada *primer* (200 µM), 1,0 µL de dNTP (10 mM), 0,2 µL de enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (5,0 u/µL) (Promega) e, aproximadamente 50 ng de amostra de DNA. As reações de PCR foram desenvolvidas em termociclador modelo *Veriti* (Applied Biosystem-EUA). Os amplicons foram checados em gel de agarose 1%, com marcador molecular de 1 Kb (Avatti), corado com GelRed (Uniscience), e a imagem foi visualizada e capturada em transluminador (Applied Biosystems).

Tabela 1- *Primers* e programas utilizados para a amplificação dos genes relacionados com a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbica.

| Enzimas | Primer | Referência | Programas |
|-------------------------------------|------------|-----------------------|---|
| Nitrato redutase periplasmática | NAP1 | (Zhu et al. 2012) | 94° C por 5 min, 35 ciclos (94° C por 30 s, 59° C por 30 s, 72° C por 1 min) e 72° C por 7 min. |
| | NAP2 | | |
| Nitrato redutase de membrana | NarG-A241f | (Auclair et al. 2010) | 94 ° C por 5 min, 35 ciclos (94° C por 30s, 50° C por 40s, 72 ° C por 1 min) e 72 ° C por 7 min. |
| | NarG-631r | | |
| Nitrito redutase para óxido nítrico | NirSF | (Wan et al. 2011) | 94° C por 5 min, 35 ciclos (94° C por 45s, 56°C por 45s, 72° C por 45s) e 72° C por 10 min. |
| | NirSR | | |
| Nitrito redutase para óxido nítrico | NirKF | (Wan et al. 2011) | 94° C por 5 min, 35 ciclos (94° C por 45s, 56°C por 45s, 72° C por 45s) e 72° C por 10 min. |
| | NirKR | | |
| Óxido nítrico redutase | NorBF | (Wan et al. 2011) | 94° C por 10 min, 30 ciclos (94° C por 1min, 55°C por 1min, 72° C por 1,5min) e 72° C por 10 min. |
| | NorBR | | |
| Óxido nítrico redutase | NosZF | (Wan et al. 2011) | 94° C por 10 min, 30 ciclos (94° C por 1min, 58°C por 1min, 72° C por 1,5min) e 72° C por 10 min. |
| | NosZR | | |
| Oxidação Hidroxilamina a nitrito | HaoF1 | (Yang et al. 2015) | 94° C por 5 min, 10 ciclos (94° C por 1min, 50°C por 1min, 72° C por 1,5min), 20 ciclos (94° C por 1min, 54°C por 1min, 72° C por 5min) e 72° C por 10 min. |
| | HaoF3 | | |

As enzimas utilizadas e suas respectivas funções foram Nap = Nitrato redutase periplasmática; NarG= Nitrato redutase de membrana (respiração anaeróbica do nitrato); NirS= Nitrito redutase para óxido nítrico (citocromo cd1 nitrito redutase); NirK= Nitrito redutase para óxido nítrico; NorB= Óxido nítrico redutase; NosZ= Óxido nitroso redutase; HaoF= Hidroxilamina a nitrito.

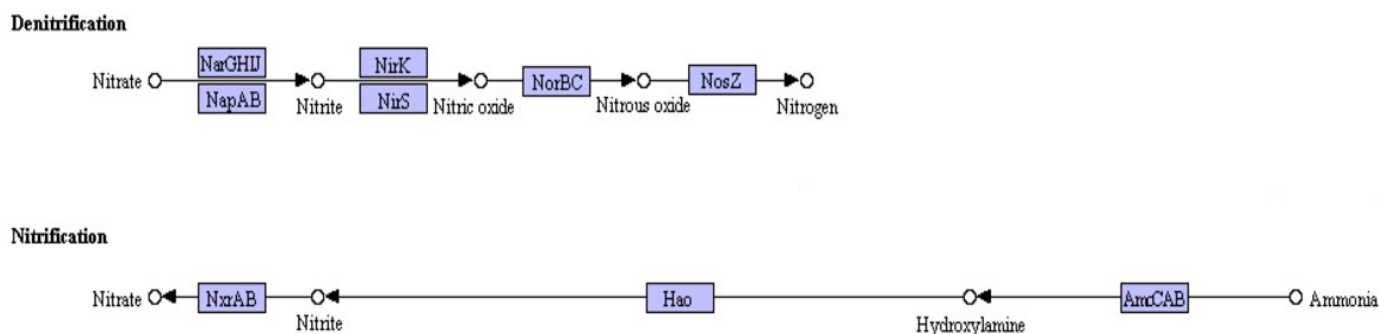


Figura 2. Enzimas relacionadas aos processos de nitrificação e desnitrificação. Fonte: KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

2.4 Avaliação da eficiência de remoção de amônia

A taxa de remoção de amônia foi avaliada por teste colorimétrico no meio de cultivo HMN seguindo a metodologia de Chaney e Marbach (1962). As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços, contendo em cada poço: 5 μ l de meio de cultivo inoculado com cada isolado, 100 μ l de reagente de fenol (50 g de fenol sólido, 0,25 g de nitroprussiato de sódio, completar para 1000 ml com água destilada) e 100 μ l de reagente de hipoclorito (25 g de NaOH, 16,9 ml de hipoclorito com 4-6% de cloro, completar para 1000 ml com água destilada). As placas foram incubadas por 20 minutos a 39 °C, e então a absorvância foi lida no comprimento de onda de 630 nm no espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific). Como controle positivo, foi adicionado 5 μ l de lodo ativado cultivado em HMN, e como negativo, foi adicionado 5 μ l de HMN sem inóculo. As análises

de remoção de amônia foram realizadas ao longo de 7 dias, quando a taxa de remoção permaneceu constante. As análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Detecção de N₂ e N₂O através de cromatografia gasosa

Para validação da ocorrência da nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia, foram monitoradas a produção dos gases N₂ e N₂O por cromatografia gasosa (GC), em parceria com o CPQBA/UNICAMP. Um e meio mililitros de cada isolado foram inoculados em 15 ml de meio HMN contidos em frascos de 30 mL. Os frascos foram hermeticamente fechados e a atmosfera no interior do tubo foi saturada com oxigênio (99,5% de pureza), uma vez que o processo de nitrificação é aeróbio, e também para garantir que todo o nitrogênio detectado fosse proveniente do processo de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia. Os tubos foram incubados a 30° C com agitação de 150 rpm. O controle negativo foi feito utilizando o meio HMN sem inóculo, e o positivo utilizando o lodo ativado inoculado em meio HMN. As amostras de gás foram coletadas em três pontos, 0, 5 e 10 dias, usando uma seringa coletora de gás de 1 ml. Um volume de 100 microlitros de gás foi aplicado em um cromatógrafo gasoso acoplado com espectômetro de massa (Cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP-6890 acoplado a detetor seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975) equipado com uma coluna HP-Plot 5A *molecular sieve column* (30 m x 0.32 mm x 25 µm) (Sigma Aldrich). O modo SIM foi escolhido para detectar os picos característicos de N₂ e NO₂, e as temperaturas da coluna para detecção dos gases foram 35 e 200 °C, respectivamente. O gás He foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 3 ml/min (Yao et al., 2013). As análises foram realizadas em duplicata.

2.6 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos

Os isolados obtidos foram submetidos ao sequenciamento da região conservada do gene DNAr 16S. Para isso, o DNA das bactérias foi extraído como descrito por Pospiech & Neumann (1995). Após extração, o DNA foi submetido à reação de PCR utilizando o par de primers 10f e 1100r (Lane et al., 1991), homólogos a regiões conservadas do gene RNAr 16S do Domínio Bacteria. Para tanto, aproximadamente 30 ng de DNA foram usados em reações independentes de 50 µL que continham 0,5 pmol/µL de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, tampão 1X da enzima e 2,5 U de Taq DNA Polimerase. As amplificações foram realizadas com temperatura inicial de 94 °C por 1 min, 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, seguidos de 5 min a 72 °C de extensão final. Os amplicons foram checados em gel de agarose 1%, corado com GelRed com GelRed (Uniscience), e a imagem foi visualizada e capturada em transluminador (Applied Biosystems).

Os fragmentos do DNAr 16S amplificados a partir de cada isolado foram purificados utilizando GFX 96 PCR Purification Kit (GE Health Care) e sequenciados em sequenciador automático ABI: *Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* (Applied BioSystems), tampão *Save Money* (Tris-HCl 0,1M, MgCl₂ 0,5mM), 3,2 mols dos *primers*. Esta etapa foi realizada pela Divisão de Recursos Microbianos (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP).

2.8 Montagem dos *contigs* e análise taxonômica

As sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas com cada *primer* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa *phredPhrap* (Ewing et.al, 1998) e comparadas com as sequências de RNAr 16S de organismos representados nas bases de dados *Genbank*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA, <http://www.rdp.cme.msu.edu/>), usando as rotinas BLASTn e SequenceMatch, respectivamente.

3. Resultados e Discussão

3.1 Avaliação da eficiência de remoção de amônia

Os resultados da avaliação da remoção de amônia pelos isolados ao longo de sete dias estão representados na Figura 4. Como pode ser observado, após 3 dias de inoculação a taxa de remoção de amônia foi de 100% para a maioria dos isolados. Este resultado condiz com o encontrado na literatura, mostrando que o processo de remoção de amônia por esses isolados pode ocorrer de maneira mais eficiente do que o processo de nitrificação autotrófica, onde os microrganismos possuem crescimento mais lento, consequentemente a remoção de amônia é mais lenta (Yao, et al., 2013; Zheng, et al., 2012).

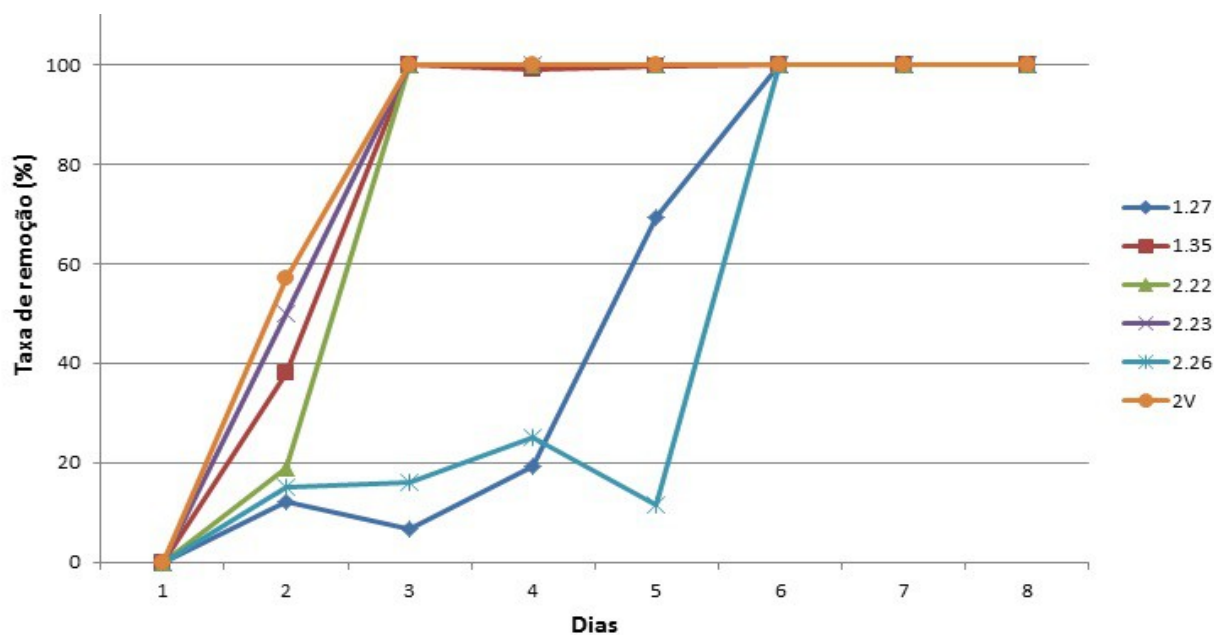


Figura 4. Taxas de remoção de amônia obtidas pelo teste colorimétrico para os seis isolados analisados.

3.2 Avaliação da nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia através de cromatografia gasosa

Através da detecção qualitativa do gás nitrogênio por cromatografia gasosa foi avaliado a ocorrência do processo de nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbica. Como observado na Figura 5, todos os seis isolados apresentaram um pico maior que o controle negativo, que consistia no meio sem inoculação de nenhum micro-organismo, sendo assim, houve a produção do gás nitrogênio por todos eles. Dentre todos isolados, o 1.27 e o 2.26 foram os que apresentaram um pico de menor intensidade. O mesmo pode-se observar para a remoção de amônia, esses isolados foram os que mais demoraram a atingir 100% de remoção.

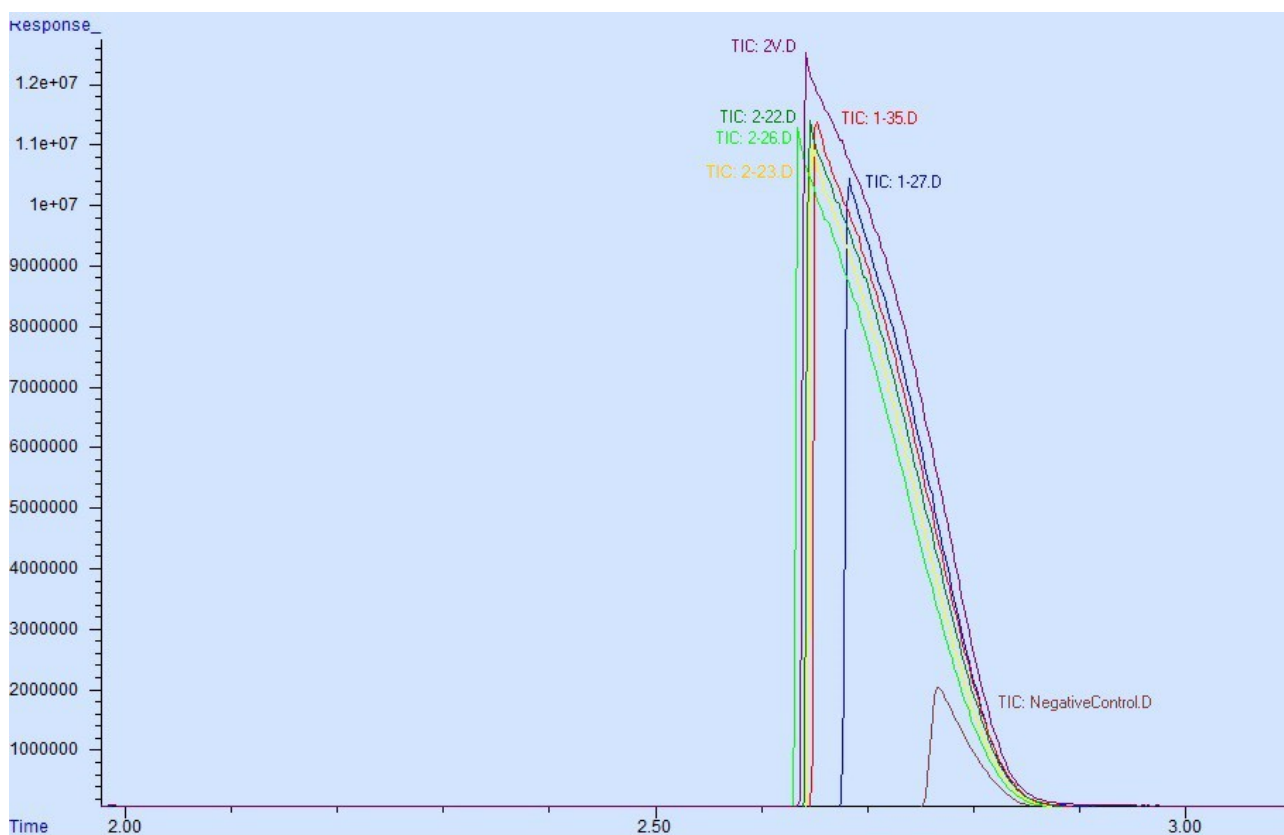


Figura 5. Detecção do gás nitrogênio por cromatografia gasosa pelos isolados bacterianos após 10 dias de inoculação.

heterotrófica/desnitrificação aeróbica utilizando outra via, diferente das conhecidas até o momento.

Tabela 2- Resultados das amplificações dos genes que codificam enzimas relacionadas aos processos de nitrificação e desnitrificação. (+) houve amplificação; (-) não houve amplificação. (C+: Lodo bruto) Enzimas: Nap = Nitrato redutase periplasmática; NarG= Nitrato redutase de membrana (respiração anaeróbica do nitrato); NirS= Nitrito redutase para óxido nítrico (citocromo cd1 nitrito redutase); NirK= Nitrito redutase para óxido nítrico; NorB= Óxido nítrico redutase; NosZ= Óxido nitroso redutase; HaoF= Hidroxilamina a nitrito.

| Isolados | Nap | NarG | NirS | NirK | NorB | NosZ | HaoF |
|-------------|-----|------|------|------|------|------|------|
| 1.27 | + | - | - | - | - | - | - |
| 1.35 | + | - | + | - | + | + | - |
| 2.22 | + | - | + | - | + | + | - |
| 2.23 | + | - | + | - | + | + | - |
| 2.26 | - | - | - | - | - | - | - |
| 2V | + | - | + | - | + | + | + |
| C+ | + | - | - | - | - | + | + |

3.4 Identificação Taxonômica dos isolados bacterianos

Os resultados da análise taxonômica mostraram que a maioria dos isolados foram afiliados ao gênero *Pseudomonas* e *Rhodococcus* (Tabela 3). Esses gêneros já foram amplamente descrito por obter espécies capazes de realizar a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbica (Zhang, et al., 2011; He, et al. 2016; Li, et al.; 2015). Entretanto espécies do gênero *Gordonia* ainda não haviam sido descritas como capazes de realizar a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbica.

Tabela 3- Identificação taxonômica dos isolados.

| Isolado | Identificação taxonômica |
|-------------|-----------------------------------|
| 1.27 | <i>Rhodococcus ruber</i> DSM43338 |
| 1.35 | Reenviado para sequenciamento |
| 2.22 | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| 2.23 | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| 2.26 | <i>Gordonia amicalis</i> |
| 2V | <i>Pseudomonas stutzeri</i> SD136 |

4. CONCLUSÃO

- Os microrganismos testados são capazes de realizar a nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia simultânea;
- O isolado 2.26 (*Gordonia amicalis*) é capaz de realizar nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia simultânea porém possivelmente utilizando outros genes ou outra via, diferente das conhecidas até o momento;
- Mostram-se uma boa alternativa para melhorar o processo de remoção de amônia em estações de tratamento de efluentes, pois apresentam uma boa eficiência na remoção da amônia em um curto espaço de tempo, e, além disso, realizam as duas etapas simultaneamente, podendo ser realizadas nas mesmas condições para um biorreator.

4. Referências Bibliográficas

- Abou-Elela, S. I., Kamel, M. M. e Fawzy, M. E. (2010). **Biological treatment of saline wastewater using a salt-tolerant microorganism.** Desalination 250(1): 1-5.
- Alberto Alva-Argáez, Antonis C Kokossis, Robin Smith (2007). **The design of water-using systems in petroleum refining using a water-pinch decomposition.** Journal Chemical Engineering Journal, V 128, I 1, 33-46.
- Barbosa, D (2005). **Identificação de bactérias halofílicas/halotolerantes com potencial uso no tratamento de água de produção / Deyvison Clacino Barbosa.** UFRJ/EQ, 2005.99 , xvi fl.: il.Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química.
- Bonfá, M; Grossman, M; Piubeli, F; Mellado, E; Durrant, L (2013). **Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments.** Biodegradation, Volume 24, Issue 5, pp 699-709
- CASTIGNETTI, D.; HOLLOCHER, Thomas C. **Heterotrophic nitrification among denitrifiers.** Applied and Environmental Microbiology, v. 47, n. 4, p. 620-623, 1984.
- Cheneby, D., Hallet, S., Mondon, M., Martin-Laurent, F., Germon, J. C., & Philippot, L. (2003). **Genetic characterization of the nitrate reducing community based on narG nucleotide sequence analysis.** Microbial ecology, 46(1), 113-121.
- Dalmacija, B., Karlovic, E., Tamas, Z. e Miskovic, D. (1996). **Purification of high-salinity wastewater by activated sludge process.** Water Research 30(2): 295-298.

Motta, M. D., Pons, M. N., Roche, N. I. C. O. L. A. S., Vivier, H. E. R. V. É., Amaral, A. L., Ferreira, E. C., & Mota, M. A. N. U. E. L. (2003). **Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso.**

Dan, N.P. (2001). **Biological treatment of high salinity wastewater using yeast and bacterial systems** Tese de Doutorado, Asian Institute of Technology-School of Environment, Resources and Development, Bangkok, Thailand.

Deole R, Challacombe J, Raiford DW, Hoff WD (2013). **An extremely halophilic proteobacterium combines a highly acidic proteome with a low cytoplasmic potassium content.** J Biol Chem. 4;288(1):581-8.

Edwards, C. (1990). Microbiology of extreme environments. McGraw-Hill. Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M., Green P. (1998). **Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment.** *Genome Res.* 8:175–185.

Gharsallah, N., Khannous, L., Souissi, N., Nasri, M. (2002). **Biological treatment of saline wastewaters from marine-products processing factories by a fixed-bed reactor.** Journal of Chemical Technology & Biotechnology 77: 865-870.

Gomes, L.P., 2009. **Estudos de Caracterização e Tratabilidade de Lixiviados de Aterros Sanitários para as Condições Brasileiras.** PROSAB – Programa de Pesquisas em Saneamento Básico. Resíduos Sólidos. Rio de Janeiro: ABES. 2009.

González-Muñoz M; Linares,C; Martínez-Ruiz, F; Morcillo, F; Martín-Ramos M; Arias, J. (2008). **Ca–Mg kutnahorite and struvite production by *Idiomarina* strains at modern seawater salinities.** Chemosphere, Volume 72, Issue 3, Pages 465–472.

Gray, N.F. **Biology of wastewater treatment.** 2 ed. Londres: Imperial College Press, 2004,v.4.

HE, Tengxia et al. **Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion.**

Bioresource technology, v. 200, p. 493-499, 2016.

Jordão, E.P.;Pessoa,C.A (2005). **Tratamento de Esgotos Domésticos.** 4. ed., Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária – ABES. 932p.

Kargi, F. e Dincer, A. R. (1997). **Biological Treatment of Saline Wastewater by Fed-Batch Operation.** Journal of Chemical Technology & Biotechnology 69(2): 167-172.

Kargi, F., Dinçer, A.R. (1996). **Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewaters by fed-batch operation.** Enzyme & Microbial Technology 19: 529-537.

Lane, D.J. (1991) **16S/23S rRNA sequencing.** *In:* Goodfellow, M. & Stackebrandt, E. (eds.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics.** p. 115-147. John Wiley & Sons, Chichester.

Lefebvre, O. e Moletta, R. (2006). **Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review.** Water Research 40(20): 3671-3682.

Lefebvre, O. e Moletta, R. (2006). **Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review.** Water Research 40(20): 3671-3682.

Li, C., Yang, J., Wang, X., Wang, E., Li, B., He, R., & Yuan, H. (2015). **Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24.** Bioresource technology, 182, 18-25.

Lima, A., Ribeiro, R., Ginoris, Y., Coelho, M.A.Z. (2005). **Remoção Biológica de Fenol e Nitrogênio Amoniacal de Efluentes em Reator Batelada Sequencial.** COBEQIC,

S.Paulo, Brasil.

Oren, A. (1999) **Bionergetic aspects of halophilism**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** (2):334-348.

Oren, A. (2002) **Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications**. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**:56-63.

Osaka,T., Shirotani, K., Yoshie, S., Tsuneda, S (2008). **Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process**. Department of Chemical Engineering, Waseda University, 3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

Pan Y, Huang H, Meng J, Xiao H, Li C, Meng L, Hong S, Liu H, Wang X, Jiang J. (2012). **Biodiversity of culturable halotolerant and halophilic bacteria isolated from saline-alkaline soils in Songnen Plain**. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 52(10):1187-94.

Pospiech, A. & Neumann, B. (1995) **Versatile quick-prep of genomic DNA from Gram -positive bacteria**. *Trends in Genetics.* 11:217-218.

Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. (1985). **A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water**. *Appl. Environ Microbiol* 49: 1-7.

Roberts, M. F. (2005). **Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms**. *Saline Systems*, 1: 5. <<http://dx.doi.org/10.1186/1746-1448-1-5>>

Rohban, R, Amoozegar, MA & Ventosa, A. (2009) **Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran**. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:333-340.

Shi W, Takano T, Liu S. (2012). **Isolation and characterization of novel bacterial taxa**

from extreme alkali-saline soil. World J Microbiol Biotechnol 28(5):2147-57.

Silva, Cynthia C., Aline F. Viero , Ana Carolina F. Dias , Fernando D. Andreote , Ederson C. Jesus Sergio O. De Paula , Ana Paula R. Torres , Vania M. J. Santiago, and Valeria M. Oliveira (2010). **Monitoring the Bacterial Community Dynamics in a Petroleum Refinery Wastewater Membrane Bioreactor Fed with a High Phenolic Load.** J. Microbiol. Biotechnol. q20(1), 17–25

Souza, D., Seldin L., Santos S., (2013). **Isolamento E Caracterização de Bactérias Formadoras de Esporos Halofílicas Ou Halotolerantes com Possível Aplicação em Biorremediação de Solo Contaminado com Petróleo E Água Produzida Oriundos da Extração de Petróleo em Sergipe, Brasil.** Instituto de Microbiologia CCS. Vazóller, R.F. et al (1989). **Microbiologia de lodos ativados.** São Paulo: CETESB,. 23 p.

Ventosa, A; Yanhe, M; Galinski, E; Grant,W; Oren, A; (2010). **Halophiles 2010: Life in Saline Environments. meeting review.** applied and environmental microbiology, Nov. 2010, p. 6971–6981 Vol. 76, No. 21.

Ventosa, A., Nieto, J. J. & Oren, A. (1998) **Biology of moderately halophilic aerobic bacteria.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62** (2):504-544.

Von Sperling, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Lodos ativados.** Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 1997. 416 p.

Wang, YN, Cai, H, Chi, C-Q, Lu, A-H, Lin, X-H, Jiang, Z-F & Wu, X-L (2007) **Halomonas shengliensis sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium.** Int J Syst Evol Microbiol. 55: 1222-1226.

Woolard, C. R. e Irvine, R. L. (1995). **Treatment of hypersaline wastewater in sequencing batch reactor.** Water Reasearch 29-4: 1159-1