

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS DO CICLO  
DO ENXOFRE E SELEÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS  
POTENCIALMENTE EFETIVOS NO CONTROLE DE H<sub>2</sub>S EM  
ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES**

Daniel Derrossi Meyer  
Biólogo/UFRGS

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Março de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS DO CICLO  
DO ENXOFRE E SELEÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS  
POTENCIALMENTE EFETIVOS NO CONTROLE DE H<sub>2</sub>S EM  
ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES**

Orientador: Adriano Brandelli

Co-orientadora: Gertrudes Corção

Tese apresentada como um  
dos requisitos para a obtenção do  
Grau de Doutor em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Março de 2017.

### CIP - Catalogação na Publicação

Meyer, Daniel Derrossi

Caracterização das comunidades bacterianas do ciclo do enxofre e seleção de isolados bacterianos potencialmente efetivos no controle de H<sub>2</sub>S em Estações de Tratamento de Efluentes / Daniel Derrossi Meyer. -- 2017.

115 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Coorientadora: Gertrudes Corção.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Bactérias Oxidadoras de Enxofre. 2. Bactérias Redutoras de Sulfato. I. Brandelli, Adriano, orient. II. Corção, Gertrudes, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à CAPES pela bolsa de doutorado e pela oportunidade de realizar parte da minha pesquisa fora do país por 8 meses e poder ter uma outra óptica da pesquisa científica, além de trazer, na bagagem, o conhecimento técnico e a experiência cultural que adquiri por esse período na Alemanha;

Ao meu orientador, Adriano Brandelli, por ter me aceitado como aluno de doutorado e por ter me dado todo o apoio necessário, mesmo eu apresentando uma proposta bem diferente da sua linha de pesquisa;

À minha co-orientadora, Gertrudes Corção, que sempre me auxiliou, me cedeu seu laboratório e esteve disponível para aquelas reuniões prolongadas que eu fazia questão de me estender mais uns minutinhos. Foi, com certeza, mais do que uma co-orientadora! Obrigado!

Ao Lab 166 que me acolheu (Letícia Otton, os experimentos ao teu lado ficavam muito mais divertidos), à Natália Canal, Karine Meneghetti, Ana Paula Pastore, Magda Chaves, Belize Leite, Lúcio Amorim, Marina Bastos e Marina Campos, pela ajuda técnica e pelas conversas;

À Karina Heck, por me encorajar a fazer parte da minha pesquisa na USP e na Alemanha, além de me ajudar a fazer o dendrograma para os meus isolados. Karina, obrigado pela amizade!

A toda equipe de pesquisa do professor Dr. Fernando Dini Andreote da Esalq USP de Piracicaba, em especial ao Pedro Andrade e ao Ademir Durrer por todo o apoio técnico;

À professora Adalgiza Fornaro da USP de São Paulo, por me auxiliar na etapa metodológica de detecção de sulfato;

A toda a equipe do Dr. Jan Kuever do *Bremen Institute for Materials Testing* pela oportunidade de realizar o meu doutorado sanduíche na Alemanha. Foi, de fato, uma grande experiência de vida, tanto em termos profissionais quanto pessoais;

A toda a minha família pelo incentivo e pela torcida, e aos meus amigos fora do meio acadêmico que direta ou indiretamente me ajudaram nos momentos difíceis e a Deus por todas as oportunidades que a mim foram dadas!

## Caracterização das comunidades bacterianas do ciclo do enxofre e seleção de isolados bacterianos potencialmente efetivos no controle de H<sub>2</sub>S em estações de tratamento de efluentes<sup>1</sup>

Um dos problemas em Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) é a emissão de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), podendo causar danos à saúde de populações humanas e aos ecossistemas. Para controlar a produção desse gás gerado por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), Bactérias Oxidadoras de Enxofre (BOE) podem ser utilizadas na conversão de H<sub>2</sub>S em sulfato. A tese foi dividida em dois estudos: no estudo 1, foi realizado um teste piloto para definir a melhor metodologia para detecção de sulfato em caldo inorgânico. A detecção de sulfato foi realizada a partir de espectrofotometria, por EAA e cromatografia iônica, utilizando a linhagem *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 como padrão de referência, sendo incubada em caldo inorgânico suplementado com tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O), sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S) e sulfito de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), separadamente. O método cromatográfico foi o mais sensível para detectar sulfato, e o caldo inorgânico contendo tiosulfato de sódio foi o único que apresentou resultados diferentes em relação ao controle negativo. Tais resultados foram utilizados como padrão de referência para avaliar a produção de sulfato produzido por isolados bacterianos selecionados de diferentes ETEs. Assim, por processo de enriquecimento a partir de 8 meios seletivos, foram prospectados 37 isolados bacterianos de 5 ETEs. Posteriormente, foi feita a triagem a partir de curvas de crescimento, selecionando 12 isolados. Estes, por sua vez, foram submetidos a um novo processo de seleção (atividade respirométrica e detecção de sulfato), com o objetivo de eleger um consórcio bacteriano para ser testado em um efluente com problemas de emissão de H<sub>2</sub>S. Os 12 isolados foram identificados por sequenciamento parcial do gene *16 S do RNA ribossômico* e, por comparações com as sequências obtidas pelo NCBI, a maioria se aproximou do gênero *Pseudomonas* (9/12). No entanto, na última etapa de seleção, não foi observada produção biológica de sulfato pelos isolados selecionados, não sendo possível obter um consórcio bacteriano potencialmente competente para controle das emissões de H<sub>2</sub>S em ETEs. Por outro lado, no estudo 2 desta tese, avaliou-se a distribuição (composição, estrutura e abundância) das principais famílias de BRS e BOE a partir de 6 pontos amostrais de 5 ETEs pela metodologia de sequenciamento de alto desempenho, utilizando a porção V6 do *16S do RNA ribossômico* como marcador. Táxons específicos de BRS e BOE foram correlacionados com alguns fatores abióticos: origem do efluente (doméstico/industrial), o teor de oxigênio, o tipo de amostra (lodo ativado, biorreator anaeróbico ou lagoa de estabilização) e os atributos físico-químicos. Quando as 22 famílias de BRS e BOE foram agrupadas, as amostras apresentaram uma distribuição marcante, demonstrando padrões de agrupamento de acordo com o tipo de amostra. Para BOE, as famílias mais abundantes foram *Spirochaetaceae*, *Chromatiaceae*, *Helicobacteriaceae*, *Rhodospirillaceae* e *Neisseriaceae*, enquanto que, para SRB, foram *Syntrophaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Nitrospiraceae* e *Desulfovibrionaceae*. A estrutura e a composição das principais famílias relacionadas ao ciclo do enxofre também foram influenciadas por seis atributos químicos (enxofre, potássio, zinco, manganês, fósforo e nitrogênio). O enxofre foi o que mais influenciou a variação das comunidades bacterianas nas ETEs analisadas ( $\lambda = 0,14$ ,  $p = 0,008$ ). As OTU afiliadas a *Syntrophus* mostraram a maior resposta ao aumento do enxofre total. Todas essas descobertas podem contribuir para melhorar a compreensão em relação às comunidades de BRS e BOE, com a finalidade de buscar estratégias para melhor controlar as emissões de H<sub>2</sub>S em ETEs.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (115 p.), março, 2017.

## Characterization of the bacterial communities of the sulfur cycle and selection of potentially effective bacterial isolates to control H<sub>2</sub>S in Wastewater Treatment Plants<sup>2</sup>

One of the problems in Wastewater Treatment Plants (WWTPs) is the increased emissions of hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S), which can cause harm to the health of human populations and ecosystems. To control the production of this gas generated by Sulphate Reducing Bacteria (SRB), it is possible to use Sulfur Oxidizing Bacteria (SOB) to convert H<sub>2</sub>S to sulfate. The thesis was divided in two studies: in study 1, a pilot test was conducted to define the best methodology for the detection of sulfate in inorganic broth. Sulphate detection was performed using spectrophotometry, EAA and ion chromatography, using the *Paracoccus pantotrophus* strain ATCC 35512 as reference standard, and incubated in inorganic broth supplemented with sodium thiosulfate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O), sodium sulfate (Na<sub>2</sub>S) and sodium sulfite (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), separately. The chromatographic method was the most sensitive to detect sulphate and the inorganic broth containing sodium thiosulphate was the only one that presented different results in relation to the negative control. These results were used as reference standard to evaluate the production of sulfate produced by bacterial isolates selected from different WWTPs. Thus, by enrichment process from 8 selective media, 37 bacterial isolates from 5 WWTPs were prospected. Subsequently, there were screening processes from growth curves, selecting 12 isolates. These, in turn, underwent a new selection process (respirometric activity and sulfate detection), with the objective of electing a bacterial consortium to be tested in an effluent with H<sub>2</sub>S emission problems. The 12 isolates were identified by partial sequencing of the 16S *rRNA* gene and, by comparisons with the sequences obtained by the NCBI, the majority approached the genus *Pseudomonas* (9/12). However, in the last stage of selection, the biological production of sulfate was not verified for the selected isolates, and it was not possible to obtain a bacterial consortium potentially competent to control H<sub>2</sub>S emissions in WWTPs. On the other hand, in study 2 of this thesis, the distribution (composition, structure and abundance) of the main SRB and SOB families was evaluated from 5 WWTPs samples based on the high performance sequencing, using the V6 portion of the 16S *rRNA* as marker. SRB and SOB specific taxa were correlated with some abiotic factors: effluent origin (domestic/industrial), oxygen content, type of sample (activated sludge, anaerobic bioreactor or stabilization pond) and physical-chemical attributes. When the 22 SRB and SOB families were grouped, the samples presented a striking distribution, demonstrating grouping patterns according to the type of sample. For SOB, the most abundant families were *Spirochaetaceae*, *Chromatiaceae*, *Helicobacteriaceae*, *Rhodospirillaceae* and *Neisseriaceae*, whereas, for SRB, they were *Syntrophaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Nitrospiraceae* and *Desulfovibrionaceae*. The structure and composition of the main families related to the sulfur cycle were also influenced by six chemical attributes (sulfur, potassium, zinc, manganese, phosphorus and nitrogen). Sulfur was the one that most influenced the variation of the bacterial communities in the WWTPs analyzed ( $\lambda = 0.14$ ,  $p = 0.008$ ). The OTUs affiliated to *Syntrophus* showed the greatest response to the increase in total sulfur. All of these findings may contribute to better understanding of the SRB and SOB communities in order to seek strategies to better control H<sub>2</sub>S emissions in WWTPs.

---

<sup>2</sup> Doutoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (115 p.), March, 2017

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	<b>xi</b>
Listas de Figuras.....	<b>xii</b>
Listas de Abreviaturas e Siglas.....	<b>xiii</b>
1. INTRODUÇÃO.....	<b>1</b>
2. OBJETIVO GERAL.....	<b>2</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	<b>2</b>
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	<b>3</b>
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	<b>12</b>
4.1 Estudo 1: Seleção de isolados bacterianos oxidadores de enxofre potencialmente efetivos no controle da emissão de H <sub>2</sub> S.....	<b>12</b>
4.1.1 Coleta e Processamento das Amostras.....	<b>12</b>
4.1.2 Enriquecimento, seleção e isolamento bacteriano por técnicas dependentes de cultivo.....	<b>13</b>
4.1.3 Primeira Etapa de Seleção das Bactérias Oxidadoras de Enxofre.....	<b>16</b>
4.1.3.1 Curvas de Crescimento.....	<b>16</b>
4.1.3.2 Contagem em Placa (UFC. mL <sup>-1</sup> ).....	<b>16</b>

4.1.4 Primeiro critério de seleção de isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre.....	<b>16</b>
4.1.5 Segunda etapa de seleção de isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre.....	<b>17</b>
4.1.5.1 Preparação do Experimento.....	<b>17</b>
4.1.5.2 Análise respirométrica para medir a atividade microbiana.....	<b>17</b>
4.1.5.3 Filtração da solução aquosa.....	<b>18</b>
.	
4.1.5.4 Determinação de sulfato dissolvido por cromatografia iônica.....	<b>19</b>
4.1.6 Identificação das isolados bacterianos por sequenciamento parcial da região do DNA que codifica o gene <i>16S RNAr</i> .....	<b>19</b>
4.1.7 Análises Filogenéticas.....	<b>19</b>
4.1.8 Análise Estatística.....	<b>20</b>
4.2 Estudo 2: caracterização das comunidades bacterianas oxidadoras de enxofre (BOE) e bactérias redutoras de sulfato (BRS) em ETEs, utilizando genes marcadores funcionais .....	<b>20</b>
4.2.1 Avaliação dos atributos físico-químicos das amostras de lodo/efluentes de 6 diferentes ETEs.....	<b>20</b>
4.2.2 Extração do DNA total.....	<b>20</b>
4.2.2.1 Avaliação do perfil da comunidade bacteriana, utilizando o gene <i>16 do RNA ribossômico</i> .....	<b>20</b>



4.2.2.2 Avaliação do perfil da comunidade bacteriana, utilizando genes marcadores <i>aprAB</i> , <i>dsrAB</i> e <i>soxB</i> .....	21
4.2.2.2.1 Detecção do <i>aprAB</i> .....	21
4.2.2.2.2 Detecção do <i>dsrAB</i> .....	22
4.2.2.2.3 Detecção do <i>soxB</i> .....	22
4.2.3 Preparação do gel de agarose.....	23
4.2.6 Sequenciamento de alto desempenho e análise filogenética.....	23
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	25
5.1 Sulphate production by <i>Paracoccus pantotrophus</i> ATCC 35512 from different sulphur substrates: sodium thiosulphate, sulphite and sulphide.....	26
5.2 Bacterial communities involved in sulfur transformations in wastewater treatment plants.....	42
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
6.1 Estudo 1: Seleção de isolados bacterianos oxidadores de enxofre potencialmente efetivos no controle da emissão de H <sub>2</sub> S.....	71
6.1.1 Isolamento e enriquecimento dos isolados bacterianos.....	71
6.1.2 Primeiro processo de seleção dos isolados potencialmente oxidadores de enxofre.....	72

6.1.3 Segundo processo de seleção dos isolados potencialmente oxidadores de enxofre.....	76
6.2 Estudo 2: caracterização das comunidades bacterianas oxidadoras de enxofre (BOE) e bactérias redutoras de sulfato (BRS) em ETEs, utilizando os genes <i>aprAB</i> , <i>dsrAB</i> e <i>soxB</i> como marcadores funcionais.....	85
7. CONCLUSÕES.....	86
8. PERSPECTIVAS.....	87
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
10. ANEXOS.....	98
11. APÊNDICES.....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Principais características das amostras de Estações de Tratamento de Efluentes.....	<b>13</b>
<b>Tabela 2:</b> Diferentes meios seletivos utilizados para isolados bactérias oxidadoras de enxofre de ETEs.....	<b>15</b>
<b>Tabela 3:</b> Caracterização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos .....	<b>23</b>
<b>Tabela 4:</b> Avaliação das curvas de crescimento de 40 isolados + <i>Paracoccus pantotrophus</i> ATCC 35512 ao longo de quatro dias de incubação.....	<b>73</b>
<b>Tabela 5:</b> Resultado da amplificação de 3 genes funcionais.....	<b>86</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema de uma Estação de Tratamento de Efluente convencional.....4
- Figura 2:** Principais grupos bacterianos que atuam no ciclo do enxofre (Tortora et al., 2005).....6
- Figura 3:** Mecanismo de oxidação de diferentes formas de enxofre (Stewart et al., 2011).....11
- Figura 4:** Curva de crescimento de 40 isolados bacterianos oxidadores de sulfato após quatro dias de incubação em caldo G (tiosulfato de sódio ou sulfito de sódio) + 1% de glicose. Os valores de crescimento celular estão em UFC.mL<sup>-1</sup> .....76
- Figura 5:** Avaliação da atividade metabólica a partir da liberação e consumo de CO<sub>2</sub> para 12 isolados bactérias potencialmente oxidadores de enxofre (HU1, HU5, DE1, DE9, BR4, BR5, BN1, BN2, BN3, BN4, BN5, BN6 + controle positivo (*Paracoccus pantotrophus*). Cada isolado bacteriano foi submetido à curva de crescimento em caldo inorgânico suplementado com tiosulfato de sódio, à temperatura de 35°C em condições de microaerofilia por um período de 14 dias.....79
- Figura 6:** Somatório do CO<sub>2</sub> liberado e consumido de 13 isolados bacterianos, incluindo o *Paracoccus pantotrophus* como controle positivo.....80
- Figura 7:** Determinação de sulfato de 13 isolados bacterianos, incluindo o controle positivo (*Paracoccus pantotrophus*) + Controle Negativo (CN) por cromatografia iônica em caldo G inorgânico suplementado com tiosulfato de sódio após 14 dias de incubação, <sup>a, b</sup> Teste de Tukey (p < 0,05).....81
- Figura 8:** Dendrograma comparando as sequências do gene 16S do RNAr de 11 isolados bacterianos que apresentaram os melhores resultados para as curvas de crescimento com as sequências extraídas do banco de dados NCBI.....84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Analysis of Variance

BRS: Bactérias Redutoras de Sulfato

BOE: Bactérias Oxidadoras de Enxofre

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid

ETE: Estação de Tratamento de Efluente

H<sub>2</sub>S: Sulfeto de hidrogênio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ppm: parte por milhão

RNAr: Ácido Ribonucleotídeo Ribossômico

rpm: rotação por minute

rRNA: Ribosomal Ribonucleic Acid

SOB: Sulfur Oxidizing Bacteria

SRB: Sulfate Reducing Bacteria

UFC: Unidade Formadora de Colônia

WWTP: Wastewater Treatment Plant

## 1. INTRODUÇÃO

Ao mesmo tempo que a problemática socioambiental referente à presença de odores em ETEs existe, ainda não há uma estratégia eficaz para o controle da emissão de gases sulfurosos em sistemas biológicos dessa grandeza. Muitas indústrias, que geram grandes quantidades de efluentes, apresentam altos custos com indenizações por comprometer a saúde e a qualidade de vida da população que está em contato direto com esses gases fétidos.

Uma das alternativas para mitigar essa situação é a utilização de micro-organismos específicos que atuam no metabolismo da oxidação do enxofre, evitando a utilização de produtos químicos. Sabe-se que muitos compostos químicos como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o permanganato de potássio ( $KMnO_4$ ) vêm sendo utilizados em processos para controlar a emissão desses odores. No entanto, esses procedimentos muitas vezes são alternativas paliativas que acabam ficando muito onerosas para as ETEs, necessitando corrigir o pH, além da possibilidade de causar problemas como toxicidade e geração de outros resíduos nocivos no próprio sistema. Assim, a utilização de isolados bacterianos oxidadores de enxofre potencialmente promissores para o controle de  $H_2S$  em ETEs ainda pode ser a melhor opção, considerando a eficácia, os baixos custos e o aceite ambiental.

Embora grande parte dos estudos esteja relacionada à composição, à estrutura e à análise filogenética de bactérias oxidadoras de enxofre e de bactérias redutoras de sulfato de diferentes compartimentos ambientais, muito pouco ainda foi explorado em relação a ETEs, até porque esses sistemas são bastante recentes no Brasil em termos de funcionamento, e existe cada vez mais a necessidade de implantar novas unidades de sistemas de depuração para atender às exigências ambientais, principalmente nos grandes centros urbanos.

Utilizar marcadores funcionais contribuirá para determinar a distribuição dos principais grupos predominantes de bactérias redutoras de sulfato (BRS) e bactérias oxidadoras de enxofre (BOE) em diferentes pontos de coleta em ETEs do sul do Brasil. Além disso, métodos convencionais de cultivo e o uso de metodologias para a detecção de sulfato contribuirão para prospectar isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre a partir de ETEs. Como quase não há pesquisas sobre essa temática em ETEs, esses achados poderão colaborar para o

desenvolvendo de estudos futuros sobre bioprospecção e bioaumentação de espécies competentes na conversão de H<sub>2</sub>S em sulfato, contribuindo não só para a otimização e funcionamento, mas também para o controle das emissões de gases de origem sulfurosa em sistemas biológicos.

## **2. OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar as comunidades bacterianas oxidadoras de enxofre e as redutoras de sulfato presentes em cinco ETEs do sul do Brasil, além de selecionar isolados bacterianos potencialmente efetivos na conversão de intermediários de origem sulfurosa em sulfato, podendo contribuir futuramente para o controle das emissões de H<sub>2</sub>S em estações de tratamento de efluentes.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos 2.1.1, 2.1.2 e 2.1.3 fazem referência ao estudo 1 e os itens 2.1.4 e 2.1.5 se referem ao estudo 2 .

**2.1.1** Caracterizar, isolar e selecionar bactérias oxidadoras de enxofre das cinco diferentes ETEs que apresentaram potencial para controle de emissão de H<sub>2</sub>S;

**2.1.2** Determinar qual a metodologia que foi melhor para avaliar a presença de sulfato produzido pela linhagem *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512, com a intenção de utilizar esse parâmetro para seleção de isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre;

**2.1.3** Identificar os isolados bacterianos selecionados pela amplificação parcial do gene 16S do RNA ribossômico;

**2.1.4** Avaliar a estrutura e a composição da comunidade bacteriana, selecionando as principais famílias de bactérias oxidadoras de enxofre e bactérias redutoras de sulfato nas diferentes ETE, correlacionando com os principais atributos físico-químicos que controlam esses padrões na comunidade bacteriana;

**2.1.5** Avaliar a estrutura e a composição da comunidade bacteriana do ciclo do enxofre, utilizando genes marcadores (*drsAB*, *aprAB* e *soxB*), a fim de chegar ao nível de gênero.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Um dos problemas da industrialização é a geração e a liberação de resíduos tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e/ou teratogênicos nos mais diversos ecossistemas. Embora muitos desses resíduos sejam liberados na atmosfera e no solo, uma boa parte também contamina corpos d'água, seja de maneira intencional seja acidentalmente. Diante disso, existe também uma preocupação crescente da sociedade em relação ao aumento da contaminação de águas superficiais e subterrâneas, exigindo das autoridades soluções para esses problemas ambientais atualmente enfrentados. Governos vêm elaborando leis ambientais cada vez mais rígidas na tentativa de combater impactos ambientais causados principalmente pelo setor industrial (Henze et al., 2002). Nas últimas décadas – em países subdesenvolvidos e emergentes como o Brasil –, Estações de Tratamento de Efluentes vêm sendo construídas, a fim de atender à demanda de tratamentos para tais resíduos.

Embora muitas tecnologias venham sendo utilizadas no tratamento de efluentes, muitos problemas ainda vêm sendo enfrentados. É comum ocorrerem choques de carga, alterando muitas vezes a comunidade microbiana de seus sistemas de depuração. Outra questão importante a se considerar é que, ao comparar diferentes ETEs, observa-se grande heterogeneidade em termos de logística e de funcionamento, sem contar que cada sistema degrada compostos orgânicos distintos (efluente industrial ou doméstico). Assim, a mudança na composição e na estrutura de uma comunidade microbiana pode ocorrer tanto de forma espacial quanto temporalmente, podendo diminuir a eficiência desses sistemas de tratamento, à medida que alterações nas propriedades físico-químicas ou de logística de engenharia ocorrem (Liu et al., 2015a). Isso quase sempre acarreta diminuição do potencial de biodegradação e aumento da produção de odores (Liu et al., 2015b). Na Figura 1, observa-se um modelo de ETE com os seus principais sistemas de depuração da matéria orgânica.



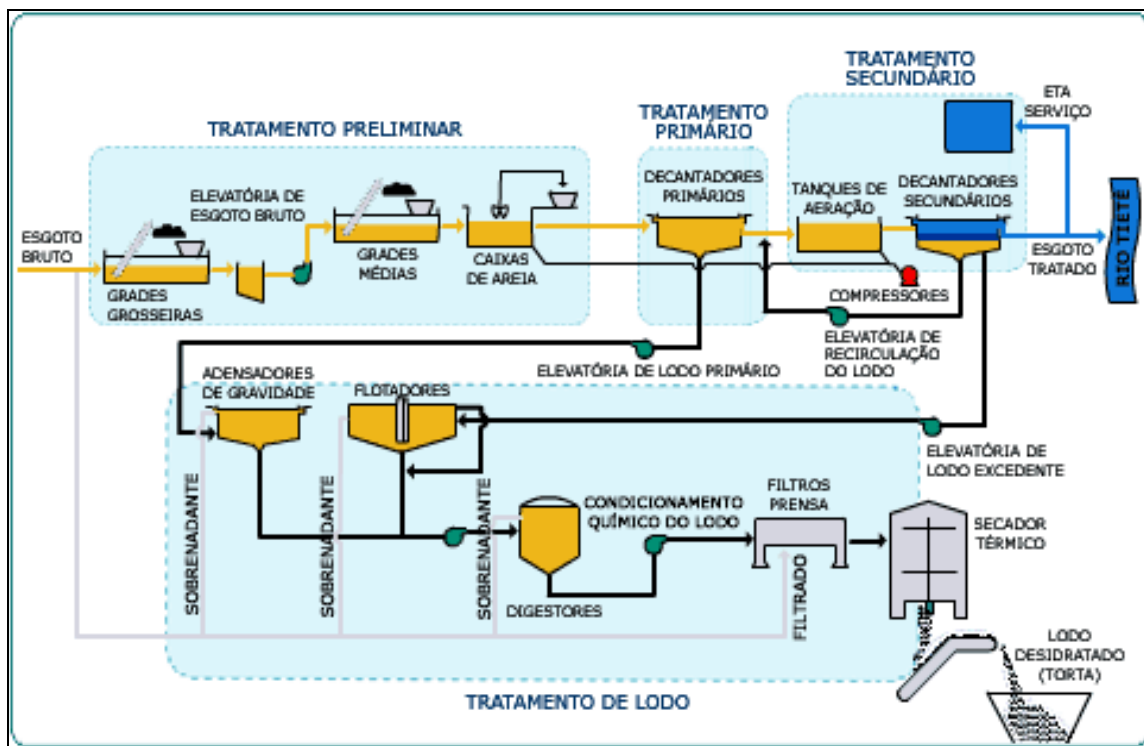


Figura 1: Esquema de uma Estação de Tratamento de Efluente convencional

Fonte: <http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=2&proj=sabesp&pub=T&nome=TratamentoDeEsgoto>

A liberação de gases malcheirosos em ETEs é uma problemática constante. Esses compostos voláteis podem ter natureza diversa, apresentando-se como mercaptanas, amônia, ácidos orgânicos voláteis e sulfeto de hidrogênio. O sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) pode ser considerado como o principal responsável na percepção de odores em ETEs cujos sistemas anaeróbicos sejam ricos em sulfato (Sá et al., 2005; Zhang et al., 2007; Rattanapan et al., 2009). Sua presença em águas superficiais é causada principalmente pela falta de oxigênio dissolvido e está associada à decomposição anaeróbica de origem biológica a partir da redução de tiosulfatos, polissulfatos, enxofre elementar, sulfitos e sulfatos a sulfetos por bactérias redutoras de sulfato (Pokorna & Zabranska, 2015). Em ETEs, a dinâmica de conversão do  $H_2S$  geralmente se concentra em sistemas como elevatórias, biorreatores anaeróbicos e lagoas de estabilização a partir de rotas metabólicas complexas (Liu et al., 2015a). As concentrações típicas de  $H_2S$  emitido de ETEs variam de 7 a 590 ppm de uma ETE à outra e podem ultrapassar quase 1000 vezes do limite aceitável (Lafita et al., 2012). No entanto, o  $H_2S$  pode ser detectado pelo olfato humano, mesmo em baixas concentrações, provocando transtornos para as

populações que vivem próximas das ETEs (Barton & Fauque, 2009), sendo um composto tóxico, inflamável, incolor, com odor característico de ovo podre.

A presença desse gás na atmosfera pode causar insônia, dor de cabeça, náusea, fotofobia, rinites, queratoconjuntivites, tosse intensa, edema pulmonar e, em concentrações acima de  $600 \text{ mg.L}^{-1}$ , pode levar o indivíduo à morte (Noyola et al., 2006). Dependendo de cada país, a faixa de 5 – 20 ppm é a concentração máxima de  $\text{H}_2\text{S}$  permitida, a fim de que trabalhadores possam ficar expostos sem efeitos adversos à saúde durante 8 horas por dia (Guidotti, 2010). Já no Brasil, a norma reguladora nº15 do Ministério do Trabalho e Emprego estabelece uma concentração de 8 ppm para limites máximos de exposição a trabalhadores cuja carga horária não ultrapasse 48 horas semanais, posto que o  $\text{H}_2\text{S}$  apresenta grau máximo de insalubridade. Ainda, segundo o CONAMA 430/2011, existem padrões para o lançamento de efluentes líquidos nos corpos de água, não podendo o sulfeto de hidrogênio em solução ultrapassar a concentração de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ . A avaliação de risco de exposição associados a ETEs permite que novas regulamentações sejam criadas para melhorar a segurança ambiental (Korzeniewska, 2011). Leis ambientais mais restritivas para a emissão de muitos poluentes conduzem indústrias a optar por um controle de poluição mais efetivo, a fim de não só obedecer a leis governamentais, mas também minimizar os custos para o tratamento (Mudliar et al., 2010). Por outro lado, o controle desses gases pode significar um desafio ao atender à legislação ambiental vigente, dado que ETEs nem sempre conseguem manter os níveis de sulfeto de hidrogênio em concentrações aceitáveis (Dhar et al., 2011; Liu et al., 2012). Atualmente, novos medidores eletrônicos de melhor eficácia têm sido desenvolvidos com baixo limiar de detecção e em resposta a diferentes espécies químicas (Chapela et al., 2014).

A dinâmica de produção de  $\text{H}_2\text{S}$  emitido pelas ETEs pode ser influenciada por inúmeros fatores ambientais como temperatura, pH, dinâmica dos ventos, sazonalidade, condições de operação, tempo de retenção de sólidos e demanda química de oxigênio (Chapela et al., 2014), além dos biológicos, como a estrutura, a composição e a dinâmica da comunidade bacteriana do ciclo do enxofre. Nesse contexto, basicamente há quatro categorias de micro-organismos que metabolizam o enxofre: 1. micro-organismos assimiladores de enxofre; 2. micro-organismos dissimiladores de compostos contendo enxofre (decompositores); 3. micro-

organismos redutores de sulfato e, finalmente, 4. micro-organismos oxidadores de enxofre (Figura 2). Para esse estudo, será dada ênfase para esses dois últimos grupos de micro-organismos descritos para melhor entender os processos de dinâmica de produção e consumo de  $H_2S$  nos sistemas de tratamento de efluentes pelas comunidades bacterianas potencialmente competentes.

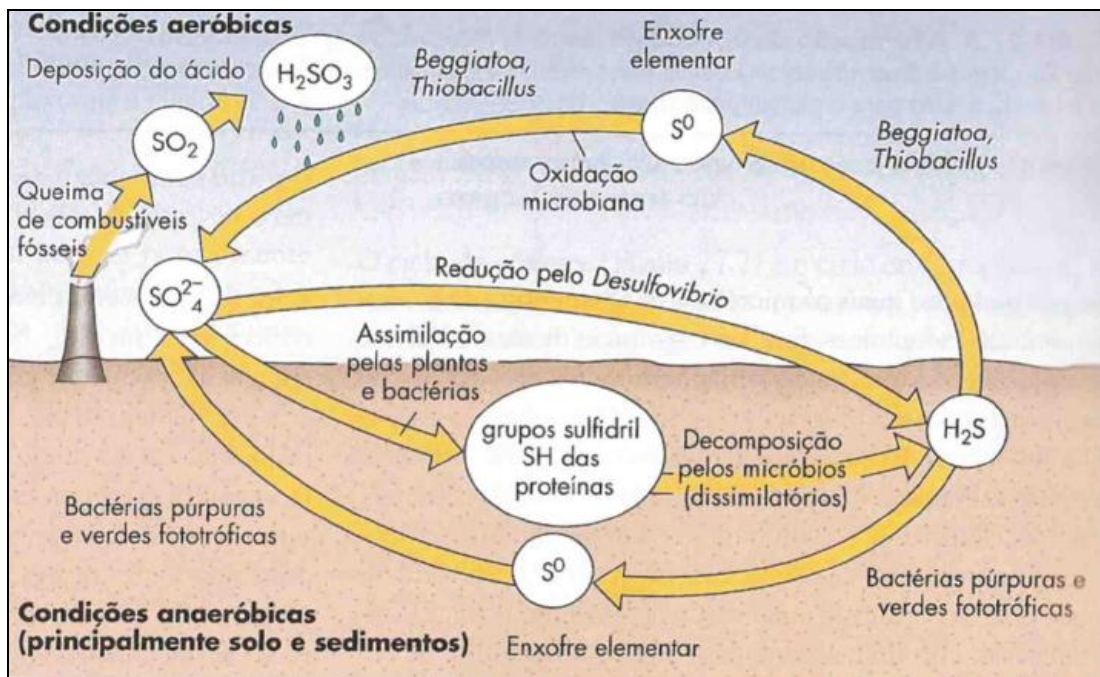


Figura 2: Principais grupos bacterianos que atuam no ciclo do enxofre (Tortora et al., 2005).

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são micro-organismos anaeróbicos que utilizam o sulfato como aceptor final de elétrons para a degradação da matéria orgânica. Elas são ubíquas em ambientes anóxicos, formando biofilmes e apresentam um importante papel no ciclo do enxofre. Eventualmente podem ser encontradas em menor número e atividade em ambientes oxigenados, pois também são potencialmente competentes em formar agrupamentos para gerar um micro-ambiente anaeróbico (Gall & Xavier, 1996). Diante disso, as BRS são a causa principal da produção de odores em ETEs, uma vez que produzem o  $H_2S$ , que é altamente reativo, corrosivo e tóxico (van den Brand et al., 2015). Esse grupo de bactérias distribui-se principalmente dentro do filo *Delta Proteobacteria*, mas também pode ser encontrado em outros grupos do domínio *Bacteria* (*Nitrospirae*, *Clostridia*,

*Thermodesulfobiaceae*, *Thermodesulfobacteria*) e do *Archaea* (Muyzer & Stams, 2008).

Há muitos métodos existentes para a remoção de poluentes atmosféricos produzidos em ETEs, incluindo incineração, adsorventes físicos, purificadores químicos e tratamentos biológicos (Estrada et al., 2011). Muitos autores defendem que processos biológicos se mostram mais eficientes na remoção de H<sub>2</sub>S em ETEs do que processos químicos, visto que existe maior afinidade das bactérias oxidadoras do enxofre (BOE) pelo substrato, sem levar em conta que produtos químicos, embora possam controlar as emissões de gases responsáveis pelo odor, acabam ou por gerar outros resíduos no sistema ou por serem processos muito onerosos (Kantachote et al., 2004; Kantachote et al., 2008; Kobayashi et al., 2012). Diante disso, tratamentos físicos e químicos para remoção de odores em ETEs estão sendo substituídos por tratamentos biológicos que utilizam micro-organismos (Lebrero et al., 2011), como em processos de biofiltração por exemplo (Rabbani et al., 2015). Sistemas biológicos funcionam do princípio que micro-organismos como bactérias atuam como catalisadores por meio da conversão de componentes voláteis. Esses micro-organismos são imobilizados na superfície de um meio poroso, formando um biofilme dentro de um biofiltro (Bernstein et al., 2014). Os micro-organismos se prendem à superfície de um meio pelas substâncias poliméricas extracelulares. A composição da comunidade microbiana em um biofilme pode ser usada no sistema biológico dependendo do tipo, natureza ou concentração do gás no sistema. Biofilmes em larga escala de operação para remoção de odores envolvem o uso de consórcios microbianos, culturas mistas ou lodo em vez de culturas puras (Jensen et al., 2011).

Dessa forma, Bactérias Oxidadoras de Enxofre (BOE) podem ser empregadas durante o processo cuja diversidade metabólica tanto fotoautotrófica quanto quimiolitotrófica é ampla, apresentando potencial em transformar sulfeto de hidrogênio, enxofre elementar, sulfito, tiosulfato, dentre outros compostos, em sulfato. Para o crescimento das fotoautotróficas, dois tipos de reação sob condições de luz promovem a conversão de energia luminosa em química e, no escuro, a redução de CO<sub>2</sub> em compostos orgânicos, utilizando o estoque de energia na forma de ATP (Madigan & Martinko, 2006):

1. Bactérias verdes oxidadoras de enxofre utilizam sulfeto por meio de enxofre elementar, transformando em sulfato. Deve-se notar também que elas, em comparação a outros organismos fototróficos, podem utilizar suas funções em condições de intensidade luminosa mais baixa (Tang et al., 2009), além de serem capazes de realizar fotossíntese em condições anaeróbicas, mas não de crescerem na ausência de luz. Elas incluem gêneros tais como *Chlorobium*, *Chloroherpeton*, *Prosthecochloris*, *Pelodictyon* e *Ancalochloris* (Pokorna & Zabranska, 2015);

2. Bactérias púrpuras oxidadoras de enxofre (*Allochromatium*, *Chromatium*, *Thioalkalicoccus*, *Thiorodococcus*, *Thiococcus*, *Thiocystis*, *Thiospirillum*) estocam enxofre na forma de partículas esféricas dentro das células. Subsequentemente, a oxidação ocorre, e sulfatos são produzidos e liberados pela célula. Elas também podem utilizar compostos orgânicos, sendo assim, consideradas como bactérias fotolitotróficas facultativas (Pokorna & Zabranska, 2015).

Já as bactérias quimiolitotróficas oxidadoras de enxofre utilizam energia de compostos inorgânicos contendo enxofre reduzido ( $H_2S$ , tiosulfato, sulfito e enxofre elementar), mas, em alguns casos, também de compostos orgânicos contendo enxofre (Cattaneo et al., 2003). O  $CO_2$  é geralmente usado como fonte de carbono para a construção de novas células. São gram negativas e, em termos de condições de crescimento, há uma grande diferença metabólica, mesmo para várias espécies do mesmo gênero. Suas temperaturas ótimas de crescimento podem variar de 4 a 90 °C, e valores de pH, dentre 1 e 9. A maioria das bactérias quimiolitotróficas estudadas se desenvolve melhor em condições meso ou termofílicas (Tang et al., 2009). As BOE quimiolitotróficas podem ser classificadas em 4 grupos de acordo com a sua fonte de carbono e energia:

1. Quimiolitotróficas obrigatórias, utilizando  $CO_2$  como fonte de carbono e diferentes compostos inorgânicos contendo enxofre (algumas espécies de *Thiobacillus* e *Thiomicrospira*) (Pokorna & Zabranska, 2015);

2. Quimiolitotróficas facultativas, utilizando  $CO_2$  para construir suas células e material inorgânico para aquisição de energia, mas também são capazes de utilizarem compostos orgânicos heterotroficamente (*Paracoccus denitrificans* e muitas espécies de *Thiobacillus*, *Thermothrix*, *Sulfolobus*) (Pokorna & Zabranska, 2015);

3. Quimiolitotróficas que são capazes de obter energia pela oxidação de compostos contendo enxofre reduzido, mas não podem obter CO<sub>2</sub> da atmosfera (muitas espécies de *Beggiatoa* e *Thiobacillus*) (Pokorna & Zabranska, 2015);

4. Outras bactérias que oxidam compostos contendo enxofre sem ganho de energia das reações (*Thiobacterium*, *Thiothrix*) (Pokorna & Zabranska, 2015).

Muitos gêneros desse grupo, tais como *Acidianus*, *Acidithiobacillus*, *Aquaspirillum*, *Aquifer*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Starkeya*, *Sulfolobus*, *Thermithiobacillus*, *Thiobacillus* e *Xanthobacter* são consagrados na literatura por apresentarem maquinaria fisiológica e genética para controle de odores presentes em muitos compartimentos ambientais como solos, estuários marinhos, plantação de arroz, lixiviado de mineração, águas termais, lagos alcalinos e hipersalinos (Vidyalakshmi et al., 2009; Krishnani et al., 2010; Oh et al., 2011; Tourova et al., 2013). No entanto, pouco se conhece sobre a composição e a estrutura das comunidades das BRS e BOE principalmente no Brasil, dado que Estações de Tratamento de Efluentes são sistemas bastante recentes em termos de funcionamento.

Utilizar o sequenciamento do gene *16S do RNAr* para analisar a comunidade bacteriana total possibilita realizar uma comparação entre os grupos bacterianos de interesse, tais como o BRS e BOE, com a comunidade bacteriana total. Assim, é possível que sejam avaliados diferentes parâmetros como abundância, riqueza e diversidade relativas, além de prospectar grupos taxonômicos predominantes na comunidade microbiana. Apesar de o sequenciamento de alto desempenho ser uma ferramenta recente para o levantamento de informações sobre a distribuição de comunidades bacterianas em amostras ambientais, a grande maioria dos estudos usa o gene *16S do RNAr* como marcador molecular para caracterizar a comunidade bacteriana total em ETEs, relacionando as características físico-químicas das amostras ambientais com os grupos bacterianos de interesse (Xia et al., 2010; Belila et al., 2013; Kim et al., 2013; Ye & Zhang, 2013). No entanto, a utilização do *16S do RNAr* também pode fornecer algumas limitações ao prospectar grupos bacterianos do ciclo do enxofre, como a dificuldade de estabelecer análises filogenéticas de grupos de interesse em nível taxonômico mais específico, como gênero e espécie. Dessa forma, estudos sobre BRS e BOE em amostras ambientais têm sido obtidos a partir de genes funcionais, como *soxB*

(somente para BOE), *dsrAB* e *aprAB* ( para ambos os grupos), relacionando-os ao metabolismo do ciclo do enxofre e permitindo uma ampla cobertura de dados para avaliação de sua composição e análise filogenética, já tendo como base a seleção dos grupos de interesse (Wagner et al., 1998; Petri et al., 2001; Meyer et al., 2007; Meyer & Kuever, 2007; Luo et al., 2011; Tourova et al., 2013, Wang et al., 2014).

Genes funcionais codificam enzimas chave responsáveis pelas rotas metabólicas de grupos taxonômicos específicos, como é o caso dos processos de redução de sulfato e oxidação do enxofre. Dentro dessa óptica, são muito mais adequados para se analisar e determinar a complexidade filogenética de comunidades microbianas relacionadas ao ciclo do enxofre (Meyer & Kuever, 2007). A rota do complexo multienzimático mediado pelos genes *sox* tem sido observada em um amplo grupo de procaríotos ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ - *Proteobacteria*, além de *Chlorobia* e *Chloroflexi*), sendo esse operon responsável pela oxidação do tiosulfato em sulfato (Friedrich et al., 2001; Kappler et al., 2001; Ghosh & Dam, 2009). O *soxB* é um gene bastante conservado entre as espécies oxidadoras do enxofre, cuja função é expressar a enzima sulfato tiosulfato redutase no estágio final do processo de oxidação do tiosulfato a sulfato. Assim, o gene *soxB* pode ser utilizado como um marcador molecular para detectar a presença de bactérias oxidadoras de enxofre isoladas de amostras ambientais (Petri et al., 2001; Meyer & Kuever, 2007; Luo et al., 2011; Tourova et al., 2013).

Outros genes marcadores funcionais como *dsrAB* e o *aprAB* também cumprem esse papel, mostrando-se presentes tanto em BOE quanto em BRS (Lenk, 2006; Meyer & Kuever, 2007). Além de ser considerado ubíquo em BRS, há evidências de que o complexo sulfito redutase (*DsrAB*), associado a outras proteínas, seja essencial para a oxidação de sulfito (Dahl et al., 2005). Sua subsequente oxidação a sulfato pode ser mediada pela principal enzima denominada Adenosina 5' fosfossulfato "APS" redutase (*AprAB*), responsável por catalisar a ligação oxidativa de sulfito a AMP do qual é gerado APS como produto (Kappler & Dahl, 2001). A APS redutase é uma enzima considerada essencial em BRS. Além disso, proteínas homólogas foram encontradas em muitas BOE tanto sob o metabolismo fototrófico anaeróbico quanto em quimiolitotróficos anaeróbicos facultativos (Meyer & Kuever, 2007). O mecanismo de oxidação de diferentes formas químicas de enxofre foi demonstrado pela análise de metatranscriptômica,

identificando as principais enzimas-chave expressas por operons responsáveis pelo metabolismo energético do enxofre, utilizando *Solemya velum* como modelo (Figura 3).

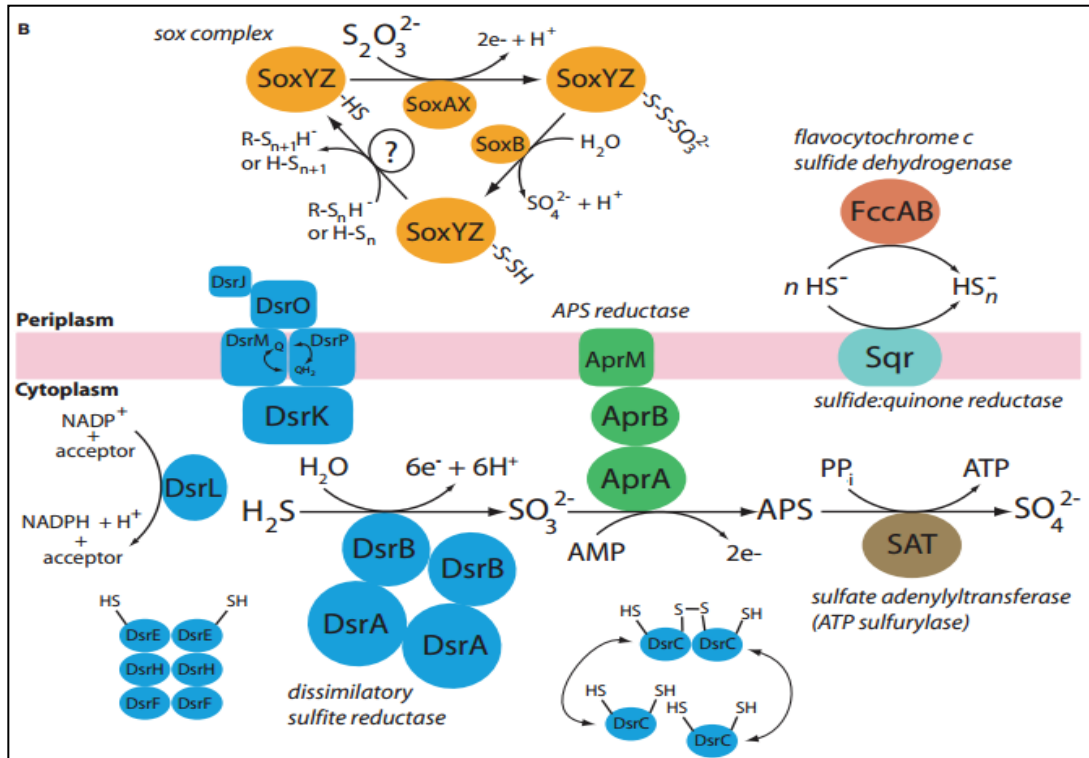


Figura 3: Mecanismo de oxidação de diferentes formas de enxofre (Stewart et al., 2011).

Diante disso, vários genes, tais como *16 S do RNAr*, *soxB*, *aprAB* e *dsrAB*, podem ser utilizados como marcadores funcionais para detectar comunidades de BRS e BOE em amostras ambientais. Muitas técnicas independentes de cultivos, como o sequenciamento de alto desempenho (*Ion torrent*), T-RFLP, RFLP, DGGE, TGGE, podem ser utilizadas como ferramentas importantes para prospecção desses micro-organismos de interesse (Petri et al., 2001; Meyer et al., 2007; Luo et al., 2011; Tourova et al., 2013).

Por outro lado, técnicas dependentes de cultivo também devem ser exploradas, uma vez que essas ferramentas contribuem para o monitoramento de outras informações a respeito de cada isolado bacteriano de interesse. Muito se tem tentado isolar bactérias oxidadoras de enxofre dos mais variados compartimentos ambientais a partir de diferentes meios minerais enriquecidos e/ou seletivos,



contendo o tiosulfato de sódio como principal componente para o processo de oxidação a sulfato (Chung & Huang, 1996; Kantachote & Innuwat, 2004; Kantachote et al., 2008). Os isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre podem ser prospectados de amostras ambientais sob diferentes condições de crescimento (variação de temperatura, pH e quantidade de oxigênio), até que se obtenha condições ótimas de cultivo. Vale lembrar que o crescimento celular para esse grupo de micro-organismos é relativamente lento (cerca de, no mínimo, uma semana sob condições ideais), visto que o metabolismo quimioautotrófico é mais fastidioso do que o heterotrófico (Kantachote & Innuwat, 2004).

Assim sendo, conhecer o perfil geral das comunidades microbianas redutoras de sulfato e oxidadoras de enxofre em amostras de Estações de Tratamento de Efluentes pode ser um passo importante na tentativa de solucionar problemas relacionados a odores de origem sulfurosa nos mais variados sistemas de depuração da matéria orgânica em ETEs.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O delineamento experimental foi dividido em dois diferentes estudos.

### **ESTUDO 1**

#### **4.1 Estudo 1: Seleção de isolados bacterianos oxidadores de enxofre potencialmente efetivos no controle da emissão de H<sub>2</sub>S**

##### **4.1.1 Coleta e processamento das amostras**

As amostras de lodo e efluente, coletadas em quintuplicata, foram obtidas de seis diferentes pontos amostrais de cinco Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) com potencial para remoção de H<sub>2</sub>S, no período de junho a julho de 2013. Foram eleitas as ETEs que, ao mesmo tempo que apresentavam problemas de odores em um ponto, tinham o problema controlado em outro, por se acreditar que a comunidade bacteriana oxidadora do enxofre estava presente e ativa nesses locais

de depuração. Foram coletadas amostras de quatro diferentes efluentes domésticos e duas de efluentes industriais (Tabela 1). Foi coletado cerca de 1 L de amostra em frascos de polietileno esterilizados, sendo acondicionada a 4°C até chegar ao laboratório. Uma parcela representativa e homogeneizada das amostras foi estocada em tubos cônicos de 50 mL com 20% de glicerol a -80°C até a extração do DNA genômico.

Tabela 1: Principais características das amostras de Estações de Tratamento de Efluentes

Amostra (ETE)	Tipo de efluente	Local de coleta do efluente	Origem
BN	Doméstico	Lagoa Anaeróbica (6m) (LA) Lagoa Facultativa (2,5 m) (LF)	Porto Alegre, RS
HU	Doméstico	Lodo Ativado	Porto Alegre, RS
PF	Doméstico	Lodo do Biorreator Anaeróbico	Passo Fundo, RS
DE	Industrial	Lodo do Biorreator Anaeróbico	Lajeado, RS
BR	Industrial	Lodo do Biorreator Anaeróbico	Lajeado, RS

#### 4.1.2 Enriquecimento, seleção e isolamento bacteriano por técnicas dependentes de cultivo

As amostras de lodo e efluentes de 5 ETEs, além de uma amostra de um produto comercial (OD), utilizado para redução de odores em locais como canis, ralos e fossas de residências, foram submetidas, em quintuplicata, à técnica de enriquecimento com meio aquoso mineral por 21 dias a 30°C, sendo realizada uma transferência de 1 mL por semana para um novo erlenmeyer de 250 mL com mesma quantidade (100 mL) de meio mineral [2g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,4g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,2 de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2g de  $\text{NaHCO}_3$ ; 8g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;

1000 mL de água destilada (Chung & Huang, 1997) e 1mL de elementos traço (50g de Na<sub>2</sub>EDTA; 7,34g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 2,2g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O; 11g de NaOH em 1000 mL de água estilada (adaptado de DSMZ, 2002) e ajustado a pH 7], denominado caldo G, a fim de obter bactérias quimioautotróficas com potencial para oxidar compostos contendo enxofre. O mesmo procedimento foi realizado em duas condições distintas para aumentar a capacidade de isolamento por técnicas de cultivos convencionais. Na primeira condição, os frascos foram agitados a 100 rpm (aerobiose) e, no segundo, a incubação foi realizada de forma anaeróbica (sem agitação e com uma camada de 5 cm de óleo mineral), de acordo com metodologia de Kantachote et al. (2008). Após o enriquecimento, realizou-se o isolamento de bactérias a partir de meios seletivos contendo formas reduzidas de enxofre como fonte de energia. Os meios seletivos foram discriminados na Tabela 2. Posteriormente, os isolados foram caracterizados por técnica de Gram e realizada a caracterização morfológica das colônias. Os isolados foram armazenados em refrigeração a -20°C e, os cultivos foram mantidos em meio sólido a 4°C, utilizando o meio G (Tabela 2), uma vez que todos os isolados obtidos apresentaram crescimento satisfatório para o referido meio.

Tabela 2: Diferentes meios seletivos utilizados para isolados bactérias oxidadoras de enxofre de ETes.

Meio A (Colmer, pH 4.8)*	Meio B (MS, pH 7.5)*	Meio C (MS + S, pH 7.5)*
5 g de NaS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	1 g de NH <sub>4</sub> Cl	1 g de NH <sub>4</sub> Cl
3 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,2 g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,1 g de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0,2 g de CaCl <sub>2</sub>	0,025 g de vermelho de fenol	0,025 g de vermelho de fenol
15 g de Agar	15 g de Agar	5 g de enxofre elementar
	1 mL de elemento traço	15 g de Agar
		1 mL de elementos traço
<b>Colmer et al. (1950)</b>	<b>Mukhopadhyaya et al. (2000)</b>	<b>Mukhopadhyaya et al. (2000)</b>

Meio D (MS + Na <sub>2</sub> S pH 7.5)*	Meio E (MSM pH 6)*	Meio F (Polissulfeto)*
1 g de NH <sub>4</sub> Cl	2 g de KNO <sub>3</sub>	0,5 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
4 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g de NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1,5 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0,5 g de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 g de NaHCO <sub>3</sub>	0,1 g de CaCl <sub>2</sub>
15 g de Agar	0,8 g de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g de solicato de sódio
0.025 g de vermelho de fenol	5 g de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.005 g de Fe-EDTA
5 g de Na <sub>2</sub> S	15 g de Agar	15 g de Agar
1 mL de elementos traço	1 mL de elementos traço	5g de Na <sub>2</sub> S
<b>Mukhopadhyaya et al. (2000)</b>	<b>Kantochote e Innuwat (2004)</b>	<b>Mukhopadhyaya et al. (2000)</b>
Meio G (tiosulfato pH 7)*	1 mL de Elementos traço (Meio G)*	Meio H (Glicose)*
2 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 g Na <sub>2</sub> EDTA	10 g de glicose
2, 47 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	7,34g de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3 g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,4 g de NH <sub>4</sub> Cl	2,2g de ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2 g de MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,5 g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1 g de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0,01 g de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	11g de NaOH	0,018 g de Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
8 g de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O		0,01 g de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
2 g de NaHCO <sub>3</sub>		15 g de Agar
1 mL de elementos traço		
15 g de Agar		
<b>Chung e Huang (1997)</b>	<b>DSMZ (2002)</b>	<b>Kantochote e Innuwat (2004)</b>

\*Meios foram padronizados para 1000 mL de água destilada

### **4.1.3 Primeira etapa de seleção das bactérias oxidadoras de enxofre**

#### **4.1.3.1 Curvas de crescimento**

Os isolados bacterianos foram submetidos ao crescimento celular em erlenmeyer de 250 mL, sendo acrescentados 100 mL de caldo G (sem ágar) (Tabela 2) com 1% de glicose. O crescimento bacteriano foi monitorado durante 4 dias de incubação, sendo que a cada 24 h realizado um ponto da curva. Os erlenmeyers foram submetidos à temperatura de 35°C, sem agitação. Constatou-se, em um experimento piloto, que o crescimento dos isolados bacterianos foi maior na ausência do que na presença de uma leve agitação (90 rpm). Os 39 isolados bacterianos prospectados de 5 ETEs e do produto comercial foram submetidos a duas diferentes curvas de crescimento (caldo G + 1% de glicose, suplementado com tiosulfato de sódio ou sulfito de sódio).

#### **4.1.3.2 Contagem em placa (UFC. mL<sup>-1</sup>)**

Posteriormente, retirou-se 1 mL de cada caldo G para a realização de diluições seriadas (concentrações de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>) em tubos de ensaio com 9 mL de solução salina 0,85% e foram adicionados 100 µL de inóculo em placas de petri descartáveis (concentrações de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-5</sup>) com os respectivos caldo G + 1% de glicose (tiosulfato ou sulfito de sódio). O inóculo foi espalhado com a alça de vidro e incubado em estufa a 35°C por até 72 h no mesmo meio G (com ágar). Após a incubação, as colônias foram contadas e padronizaram-se os valores das contagens em UFC. mL<sup>-1</sup>.

#### **4.1.4 Primeiro critério de seleção de isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre**

A partir dos resultados obtidos pelas curvas de crescimento, foram selecionados os isolados bacterianos que não só apresentaram maior crescimento celular, mas também aqueles que apresentaram menores diferenças no crescimento

celular para os diferentes compostos contendo enxofre (tiosulfato e sulfito de sódio). Dos 39 isolados bacterianos, 12 que melhor atenderam a esse critério foram selecionados para a próxima etapa de seleção.

#### **4.1.5 Segunda etapa de seleção de isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre**

Os 12 isolados selecionados pela etapa anterior foram submetidos às metodologias de análise respirométrica e produção de sulfato por cromatografia iônica, utilizando a linhagem *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 como controle positivo para tais monitoramentos. O referido delineamento foi desenvolvido a partir de um experimento piloto obtido cujos resultados foram sumarizados no artigo 1 desta tese, intitulado *Sulphate production by Paracoccus pantotrophus ATCC 35512 from different sulphur substrates: sodium thiosulphate, sulphite and sulphide*.

##### **4.1.5.1 Preparação do experimento**

Foi preparado o caldo G (sem ágar) (Tabela 2), contendo tiosulfato de sódio como composto de interesse, no qual foram distribuídos 100 mL em respirômetros de Bartha de 250 mL, hermeticamente fechados, e inoculada uma alçada de 2 colônias de cada isolado selecionado. Os frascos foram incubados por 14 dias, a 35°C, sem agitação em estufa. Os experimentos foram realizados em triplicata, incluindo o controle negativo (sem adição de micro-organismos). O crescimento bacteriano foi monitorado durante 14 dias de incubação em um intervalo de 2 a 3 dias entre os pontos da curva de crescimento.

##### **4.1.5.2 Análise respirométrica para medir a atividade microbiana**

O método respirométrico de Bartha, prescrito na norma técnica L6350 da CETESB e a NBR 14283/99, visa determinar diretamente a atividade microbiana por meio da medida de CO<sub>2</sub> produzida durante a respiração. A partir da atividade de liberação de gás carbônico é possível estimar indiretamente o crescimento microbiano ao longo do período de incubação. Os experimentos foram realizados em triplicata em respirômetros de 250 mL de capacidade. Também foram realizados

ensaios controle nos quais não foram inoculados micro-organismos ao caldo G (controle negativo). O gás carbônico produzido durante a atividade microbiana foi capturado por uma solução de KOH 0,20 M (20 mL). A solução de KOH foi removida com o auxílio de uma seringa para um novo frasco, onde foi posteriormente adicionado 1 mL de uma solução de cloreto de bário 0,5 M e gotas de fenolftaleína 1%. O KOH residual foi titulado com solução padronizada de HCl 0,2 M. A quantidade de gás carbônico produzido foi dada pela equação:

$$\text{CO}_2 \text{ gerado (mg)} = (V_B - V_A) \cdot (M_{\text{CO}_2}/2) \cdot M_{\text{HCl}} \cdot \text{FC} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$V_B$  é o volume de HCl 0,2 M utilizado para titular o branco em mL;  $V_A$  é o volume de HCl 0,2 M utilizado para titular o tratamento em mL;  $M_{\text{CO}_2}$  é a massa molar do gás carbônico em  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;  $M_{\text{HCl}}$  é a concentração molar da solução padronizada de HCl em  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; e FC é o fator de correção de molaridade de ácido/base ( $M_{\text{HCl}}/M_{\text{KOH}}$ ) (Cerqueira, 2011).

#### 4.1.5.3 Filtração da solução aquosa

Ao término dos 14 dias de incubação em caldo inorgânico, os cultivos foram filtrados em suportes com membranas de acetato de celulose estéreis de 30 mm de diâmetro e poro de 0,22  $\mu\text{M}$ , sendo a biomassa bacteriana descartada e seu sobrenadante armazenado em frascos de polipropileno a  $-18^\circ\text{C}$  até a análise da detecção do sulfato por cromatografia iônica.

#### 4.1.5.4 Determinação de sulfato dissolvido por cromatografia iônica

Íons de sulfato foram determinados à temperatura ambiente por meio da cromatografia iônica (IC), utilizando um equipamento Metrohm (modelo 851) com um detector de condutividade elétrica. As condições analíticas para a determinação de ânions foram realizadas como se segue: uma Metrosep A-5 Supl; coluna de ânions Metrohm (250 x 4 mm), solução eluente (4,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ /1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ ), taxa de 0,7  $\text{mL min}^{-1}$ , um supressor de coluna (Metrohm), e solução de

regeneração de fluxo (50 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A quantificação analítica foi realizada, utilizando uma curva de calibração externa obtida com soluções padrão. Os limites de detecção foram inferiores a 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (Vieira-Filho et al., 2013).

#### **4.1.6 Identificação das isolados bacterianos por sequenciamento parcial da região do DNA que codifica o gene 16S do RNA ribossômico.**

Os procedimentos de extração dos 39 isolados bacterianos seguiram os procedimentos do Anexo 1. Após, foi realizada a amplificação parcial do gene 16S RNA ribossômico por PCR, empregando os oligonucleotídeos iniciadores universais 8F 5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´ (Turner et al., 1999) e 1492R 5´GGTTACCTTGTTACGACTT 3´ (Lane et al., 1991) (Tabela 3).. Para a amplicação do gene *16S do RNA ribossômico*, a mistura da reação de PCR conteve 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, 5 µL de tampão PCR 10X, 3,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de dNTPs (2,5 mM), 1 µL (50 ng) de DNA e 0,05 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (100 mM) em um volume final de reação de 25 µL. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação por 4 min a 95°C. Posteriormente, foram realizados 35 ciclos com temperatura de 95°C por 30 s, 63°C por 60s, 72°C por 60s e uma extensão final de 72°C por 10 min. As reações de PCR foram lidas em sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia ESALQ/USP, utilizando apenas o *primer reverse* para o sequenciamento.

#### **4.1.7 Análises filogenéticas**

As sequências parciais do gene *16S do RNAr* foram alinhadas com outras sequências biológicas disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta *BLASTN* (Altschul et al., 1997). Alinhamentos múltiplos foram realizados com as sequências com maior identidade, com o uso do programa *ClustalW* (Thompson et al., 1994). O dendrograma foi construído com o uso do algoritmo *Maximum Likelihood* pelo programa *MEGA7* (Kumar et al., 2016), e a confiabilidade dos nós foi acessada pela reamostragem com 1000 repetições. As



árvores foram posteriormente editadas com uso do programa *Inkscape*. Quando necessário, a sequência reverso-complementar foi obtida pelo programa *BioEdit*®.

#### **4.1.8 Análise estatística**

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram comparados pela análise da variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) para comparar as médias entre os tratamentos, sendo utilizado o programa estatístico *Sisvar*, versão 4.6 (Build 60) e *SigmaPlot 12.5* para confecção dos gráficos.

## **ESTUDO 2**

### **4.2 Caracterização das comunidades bacterianas oxidadoras de enxofre (BOE) e bactérias redutoras de sulfato (BRS) em ETEs, utilizando genes marcadores funcionais**

#### **4.2.1 Avaliação dos atributos físico-químicos das amostras de lodo/efluentes de 5 diferentes ETEs**

Foram determinados em triplicata os seguintes parâmetros físico-químicos para posteriormente compará-los com o perfil das comunidades bacterianas oxidadoras de enxofre e redutoras de sulfato: pH, densidade, resíduo seco, matéria orgânica total, carbono total, carbono orgânico, relação C/N, resíduo mineral total, insolúvel e solúvel, nitrogênio total, fósforo total, potássio, cálcio, magnésio, enxofre total, cobre, manganês, zinco e ferro. Os resultados foram obtidos pelo Laboratório de Fertilidade do Solo, ESALQ/USP sob coordenação do Prof. Dr. Godofredo César Vitti.

#### **4.2.2 Extração do DNA total**

O DNA total presente nas amostras de lodo e efluentes foi extraído, utilizando o *kit PowerSoil DNA Isolation* (MO BIO Inc., Laboratories, USA), seguindo as instruções do fabricante.

#### **4.2.2.1 Avaliação do perfil da comunidade bacteriana, utilizando o gene 16S do RNA ribossômico**

A amplificação da região V6 do gene 16S do RNA ribossômico de bactérias foi realizada a partir de 18 amostras (em triplicata). Os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação a partir dos oligonucleotídeos iniciadores 967F (5'-CAACGCGAAGAACCTTACC-3') e 1046R (5'-CGACAGCCATGCANCACCT-3') (Sogin et al., 2006) (Tabela 3). Adaptadores foram adicionados aos *primers* para o sequenciamento no equipamento *Ion Torrent Personal Genome Machine* (Life Technologies, EUA). As condições de amplificação foram determinadas para reações de volume final de 25 µL, compostas por 2,5 µL de 10x Tampão de PCR, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2 µL de dNTP (2,5mM), 0,38 µL de cada *primer* (20mM) e 0,5 µL de *Taq DNA polimerase Platinum* (5U. µL<sup>-1</sup>). As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação por 5 min a 94°C. Posteriormente, foram realizados 30 ciclos com temperatura de 94°C por 30 s, 57°C por 45s, 72°C por 60s e uma extensão final de 72°C por 10 min. Após a amplificação, as amostras foram purificadas com o *kit Charge Switch PCR Clean UP* (Invitrogen, Brasil). Posteriormente, elas foram enviadas para o sequenciamento no equipamento *Ion Torrent* (Life Technologies, EUA), realizada pela equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP).

Os dados oriundos do sequenciamento foram analisados, utilizando inicialmente o programa *CLC Genomics Workbench (CLCBIO)*, em que as sequências obtidas foram separadas por amostras, de acordo com seus *barcodes*, seguido da retirada de seus adaptadores e respectivos *barcodes*, restando apenas as sequências com seus *primers*. Em seguida, todas as análises foram realizadas, utilizando o programa *QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)* (Rousk et al., 2010).

#### **4.2.2.2 Avaliação do perfil da comunidade bacteriana, utilizando genes marcadores *aprAB*, *dsrAB* e *soxB***

##### **4.2.2.2.1 Detecção do *aprAB***

Inicialmente, foi utilizado o par de *primers aprA* 1FW (5'-TGGCAGATCATGATY MAYGG-3) e *aprB* 4RV (5'-GCRCCMACNGGRCCRTA-3') (Meyer & Kuever, 2007) (Tabela 3). Para a amplificação do gene *aprAB*, a reação de PCR conteve 1,25  $\mu\text{L}$  de RED *Taq sigma* "incluído 0.4 mM  $\text{MgCl}_2$ " (0,25U. $\mu\text{L}^{-1}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão PCR 10x (RED *Taq* incluído 11mM de  $\text{MgCl}_2$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP (0,2 mM), 0,12  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (0,48 mM), 0,25  $\mu\text{L}$  de BSA (0,2 mg.mL<sup>-1</sup>) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA *template* em um volume final de reação de 25  $\mu\text{L}$ . Depois de ocorrer a desnaturação por 5 min a 94°C, foram realizados 21 ciclos com temperatura de 94°C por 60 s, temperaturas de anelamento de 60 – 45°C (diminuição de 0,7°C por ciclo) por 60 s e 72°C por 90 s. Posteriormente, 24 ciclos adicionais foram realizados com uma temperatura de 94°C por 60 s, 45°C por 60 s e 72° por 90 s, apresentando uma temperatura de extensão final de 72°C por 10 min.

#### 4.2.2.2 Detecção do *dsrAB*

Foi utilizado o par de *primers dsrp2060F* (5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3) e *dsr4R* (5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3) para a amplificação dos produtos da PCR (Wagner et al., 1998) (Tabela 3). Para a amplificação do gene *dsrA* e *dsrB*, a mistura da reação de PCR apresentou 12  $\mu\text{L}$  de Mastermix Eppendorf, 1,44  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  sigma-aldrich (25 mM), 0,096  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (100  $\mu\text{M}$ ), 1,6  $\mu\text{L}$  de BSA (20mg.mL<sup>-1</sup>) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA *template* em um volume final de reação de 25  $\mu\text{L}$ . As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação por 5 min a 95°C, 20 ciclos com temperatura de 95°C por 40 s, touch-down de 65°C a 55°C por 40 s e 72°C por 60 s e 30 ciclos com temperatura de 95°C por 40 s., 55°C por 40 s e 72°C por 60 s, apresentando uma temperatura de extensão final de 72°C por 10 min.

#### 4.2.2.3 Detecção do *soxB*

Os oligonucleotídeos iniciadores *soxB432F* 5'-GAYGGNGGNGAYACNTGG-3' e *soxB1446B* 5'-CATGTCNCCNCCRTGYTG-3' foram utilizados para a amplificação do gene *soxB* do grupo das bactérias

oxidadoras de enxofre (Lamontagne et al., 2004) (Tabela 3). Para a amplificação do gene *soxB*, a mistura da reação de PCR conteve 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, 5 µL de tampão PCR 10X (15mM Mg<sup>2+</sup>), 4 µL de dNTPs (2,5 mM), 4 µL de DNA template e 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (20 µM) em um volume final de reação de 50 µL (Luo et al., 2011). As condições da PCR estão acordo com Petri et al. (2001). Depois de ocorrer a desnaturação por 2 min a 94°C, foram realizados 10 ciclos com temperatura de anelamento de 55°C, consistindo de 30 s de extensão a 72°C, 40 s de anelamento e 30 s de desnaturação a 94°C. Posteriormente, 25 ciclos adicionais foram realizados com uma temperatura de anelamento de 47°C.

Tabela 3: Caracterização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos

Características	<i>16S do RNA ribossômico</i>	<i>16S do RNA ribossômico</i>	<i>soxB</i>	<i>dsrAB</i>	<i>aprAB</i>
Primer Forward	8F	967F	<i>soxB432F</i>	<i>dsrp2060F</i>	<i>aprA 1FW</i>
Primer Reverse	1492R	1046R	<i>soxB1446B</i>	<i>dsr4R</i>	<i>aprB 4RV</i>
Tamanho do Fragmento	1500 pb	79 pb	1014 pb	400 bp	350 pb
Controle Positivo	-	-	<i>Paracoccus pantotrophus</i> ATCC 35512	Amostras ambientais B20, B28 e B32	Amostras ambientais B20, B28 e B32
Referências	Turner et al., 1999 (8F) e Lane et al., 1991 (1492R)	Sogin et al., 2006	Lamontagne et al., 2004	Wagner et al., 1998	Meyer & Kuever, 2007

#### 4.2.3 Preparação do gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1.5 %, com tampão de corrida TAE 1X, e o processo foi realizado a 100 V durante 50 min. Para a visualização do produto amplificado, foi adicionado às amostras o corante gelRed. A análise do gel foi realizada utilizando um transiluminador de luz ultravioleta.

#### 4.2.4 Sequenciamento de alto desempenho e análise filogenética

O produto da amplificação do gene funcional *aprAB* foi enviado para a empresa LGS Genomics GmbH, Berlin, Alemanha, a fim de que fosse realizado o sequenciamento Illumina *MiSeq*. As sequências parciais do gene *aprAB* foram

alinhas com outras sequências biológicas disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLASTN (Altschul et al., 1997). Alinhamentos múltiplos foram realizados com as sequências conhecidas para o gene *aprAB* com maior identidade para os principais representantes das comunidades bacterianas do ciclo do enxofre (BRS e BOE) com o uso do programa *BioEdit 7.2*. Posteriormente, foi utilizado o programa *Mothur* para a análise dos dados do sequenciamento, seguindo o protocolo a seguir: [http://www.mothur.org/wiki/MiSeq\\_SOP](http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP).

Os dados obtidos foram apresentados na forma de artigos científicos já publicados como foram detalhados no item 5 e na forma de resultados ainda não publicados como descritos no item 6 desta tese.

## 5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados obtidos permitiram a elaboração de dois artigos científicos.

O primeiro, “*Sulfate production by Paracoccus pantotrophus ATCC 35512 from different sulphur substrates: sodium thiosulphate, sulphite and sulphide*”, referente ao estudo 1, avaliou a produção de sulfato a partir de uma linhagem referência para oxidação de compostos sulfurados, utilizando três diferentes metodologias: espectrofotometria, espectrometria de massa atômica e cromatografia iônica. Esse manuscrito foi aceito na revista *Environmental Technology* (fator de impacto: 1.76) em setembro de 2015.

O segundo, “*Bacterial communities involved in sulphur transformations in wastewater treatment plants*”, referente ao estudo 2, avalia a distribuição da estrutura e composição da comunidade bacteriana a partir do gene marcador 16S do RNAr, selecionando as principais famílias de bactérias oxidadoras de enxofre e redutoras de sulfato nas cinco diferentes Estações de Tratamento de Efluentes estudadas. Esse manuscrito foi aceito na revista *Applied Microbiology and Biotechnology* (fator de impacto: 3.376) em setembro de 2016.

## **5.1 Sulphate production by *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 from different sulphur substrates: sodium thiosulphate, sulphite and sulphide**

Daniel Derrossi Meyer<sup>a\*</sup>, Felipe Gabriel Andrino<sup>b</sup>, Simone Possedente de Lira<sup>b</sup>,  
Adalgiza Fornaro<sup>c</sup>, Gertrudes Corção<sup>a</sup>, Adriano Brandelli<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, 90050-170 Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, 13418-900 Piracicaba, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Atmosféricas, Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 1226, 05508-090 São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brazil

\* Corresponding author: Tel.:+ 55 51 3308 6249; E-mail address:

d\_biomeyer@yahoo.com.br (Meyer, D. D.)

## Abstract

One of the problems in waste water treatment plants (WWTPs) is the increase in emissions of hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ), which can cause damage to the health of human populations and ecosystems. To control emissions of this gas, sulfur-oxidizing bacteria can be used to convert  $\text{H}_2\text{S}$  to sulfate. In this work, sulfate detection was performed by spectrophotometry, ion chromatography and atomic absorption spectrometry, using *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 as a reference strain growing in inorganic broth supplemented with sodium thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), sodium sulfide ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) or sodium sulfite ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), separately. The strain was metabolically competent in sulfate production. However, it was only possible to observe significant differences in sulfate production compared to abiotic control when the inorganic medium was supplemented with sodium thiosulfate. The three methods for sulfate detection showed similar patterns, although the chromatographic method was the most sensitive for this study. This strain can be used as a reference for sulfate production in studies with sulfur oxidizing bacteria originating from environmental samples of WWTPs.

**Keywords:** sulfur oxidizing bacteria,  $\text{H}_2\text{S}$ , sulfate, *Paracoccus pantotrophus*



## 1. Introduction

The production of effluents generated by anthropogenic activity has been increasing in huge amounts. Thereby, alternative forms of treatment are sought for both domestic and industrial waste. Although many technologies have been used to reduce the environmental impacts on water bodies, many problems still need to be encountered, like the increase in emissions of volatile compounds. In particular, hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) can be considered as the main responsible for odors generation, especially in waste water treatment plants (WWTPs) [1, 2]. This fetid gas is produced by sulfur reducing bacteria present in pumping wastewater, anaerobic bioreactors and stabilization ponds from complex metabolic pathways [3].

Hydrogen sulfide can be detected by the human olfactory system, even at low concentrations, causing inconvenience to the people living close to the WWTPs, as well as generating air pollution [3]. In addition,  $H_2S$  is toxic, flammable, colorless, and presents a characteristic odor of rotten eggs. The occurrence of this gas in the atmosphere can cause insomnia, headache, nausea, photophobia, rhinitis, keratoconjunctivitis, intense coughing, pulmonary edema, and, in concentrations above  $600 \text{ mg L}^{-1}$  can lead to death of the individual [4]. In Brazil, the Ministry of Labor established a regulatory standard No. 15, which recommends worker exposure to  $H_2S$  in closed places to a maximum concentration of  $8 \text{ mg L}^{-1}$  for a workload that does not exceed 48 h per week [5]. Moreover, according to Brazilian environmental legislation, there are standards for the release of wastewater into water bodies, in which the  $H_2S$  in solution must not exceed a concentration of  $1 \text{ mg L}^{-1}$  [6]. The control of these gases could mean a challenge to meet the current environmental legislation, given that is difficult to WWTPs always keep the  $H_2S$  levels at acceptable concentrations [7, 8].

Many authors defend that biological processes are more efficient than chemical methods to remove  $H_2S$  in wastewater treatment plants, because there is a greater affinity of the sulfur-oxidizing bacteria for the substrate, without concern that chemical products can generate wastes in the system [9, 10, 11]. Thus, sulfur oxidizing bacteria that have the potential to convert hydrogen sulfide, elemental sulfur, sulfite, thiosulfate, among other compounds, to sulfate can be employed during the process. Many genera of this group, including *Acidianus*, *Acidithiobacillus*, *Aquaspirillum*, *Aquifer*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*,

*Pseudomonas*, *Starkeya*, *Sulfolobus*, *Thermithiobacillus*, *Thiobacillus* and *Xanthobacter* are consecrated in the literature, presenting physiological and genetic machinery to control odors present in many environmental compartments as soil, marine estuaries, rice plantation, leached mining, hot springs, alkaline and hypersaline lakes [12, 13, 14, 15].

The pathway of the multienzymatic complex mediated by sox gene has been observed in a large group of prokaryotes ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ - *Proteobacteria*, *Chlorobia* and *Chloroflexi*), being this system responsible for the oxidation of thiosulfate to sulfate [16, 17, 18]. The species *Paracoccus pantotrophus* was one of the first microorganisms in which functional genes of the sulfur metabolism have been unraveled. Thus, the use of sulfur oxidizing bacteria as reference standards for sulfate production from precursors of sulfur source is necessary. Compare values of sulfate production with other environmental isolates becomes advantageous to that, allowing to select a bacterial consortium with potential to convert H<sub>2</sub>S to sulfate in order to control the emissions in WWTPs.

The objective of this study was to evaluate the potential of *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 in conversion of sodium sulfide, sulfite and thiosulfate in sulfate, in order to compare the rate of degradation of these different sulfur compounds, and assess the sensitivity of three different methods to quantify of the sulfate produced during the incubation time proposed.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Media and cultivation conditions*

An inorganic broth, called broth G with modifications [19, 20] was prepared (Table 1), replacing the sulfur substrate of interest (sodium sulfide, sulfite or thiosulfate), which served as an analogous compound to simulate the presence of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in solution. The strain of *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 was inoculated into 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of broth G. Two colonies grown for up to 48 h in agar G were used for incubation. For preparing the inorganic broth, ultrapure deionized water (MilliQ) was used to avoid the ions present in the water interfere the results. The flasks were incubated for 9 days without shaking at 37°C. The experiments were performed in triplicate, including the negative abiotic control (no addition of microorganisms).

(Table 1 near here)

## 2.2. Sample preparation

The cultures were filtered through sterile supports with cellulose acetate membrane of 30 mm in diameter and 0.22  $\mu\text{m}$  pore, being the bacterial biomass discarded and its supernatant stored in polypropylene flasks at  $-18^{\circ}\text{C}$  until the analysis of sulfate by three different methodologies (spectrophotometry, atomic absorption spectrometry and ion chromatography).

## 2.3. Sulfate detection by spectrophotometry

The turbidimetric detection of sulfate as barium sulfate was used [21]. Samples of culture supernatants were diluted 1:10 (v/v) with ultrapure water (MilliQ) and then 10 mL were mixed with 1 mL of 6 M HCl solution containing 20 mg sulfur  $\text{L}^{-1}$ . After, 500 mg of  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  were added and the mixture was allowed to stand for 1 min. The tubes were shaken for 30 seconds to obtain complete dissolution of barium chloride crystals. Finally, the turbidity was measured in a spectrophotometer at 420 nm in 8 min maximum after the addition of crystals. To estimate the amount of sulfate in solution, a standard curve was developed at the concentration of 0, 2, 5, 10, 20, 25, 30 and 40  $\text{mg L}^{-1}$  S- $\text{SO}_4$ .

## 2.4. Sulfate detection by atomic absorption spectrometry (AAS)

An AAS technique with air-acetylene flame and barium (Ba) hollow cathode lamp was employed. Samples (1 mL) treated with 0.05 M  $\text{HNO}_3$  were diluted to 20 mL with ultrapure water (MilliQ), and subsequently, 5 mL of diluted samples were added to 5 mL of 60  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{BaCl}_2$  solution. The mixture was homogenized and after 2 h, it was centrifuged at 3000 g for 20 min. The remaining Ba in the solution was determined by AAS, using a Varian AA240FS Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometer. The difference between the Ba concentration of the blank and the sample was proportional to the concentration of S- $\text{SO}_4$ . For the determination the amount of sulfate, it was developed a standard curve of S- $\text{SO}_4$ , containing concentrations of 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12  $\text{mg L}^{-1}$  S- $\text{SO}_4$  in 0.05 M  $\text{HNO}_3$ .

## 2.5. Ion chromatography

Sulfate ions were determined at room temperature by ion chromatography (IC) using a Metrohm equipment (model 851) with an electrical conductivity detector. Analytical conditions for anion determination were as follows: a Metrosep A-Supp 5; Metrohm anion column (250 $\times$ 4 mm), eluent solution

(4.0 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/1.0 mmol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>), flow rate of 0.7 mL min<sup>-1</sup>, a suppressor column (Metrohm), and regenerative solution (50 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Analytical quantification was performed using an external calibration curve obtained with standard solutions. The detection limits were below 1.0 μmol L<sup>-1</sup> [22].

### 2.6 Statistical analysis

The obtained results were analyzed by ANOVA to a confidence level of 95%, and if significant, the Tukey test (comparison between mean values) was applied using the software Sisvar, versão 4.6 (Built 6.0).

## 3. Results

Sulfate production by *P. pantotrophus* cultivated on different sulfur sources was determined by three different methodologies. The data are summarized in Figure 1. The calibration curves for the turbidimetric method and EAA corresponded to the equations  $y = 0.0104 x - 0.0528$  ( $R^2 = 0.9813$ ) and  $y = - 0.0051 x + 0.2692$  ( $R^2 = 0.963$ ), respectively. Sulfate could be detected by all the methods tested in this work, including treatments in which microorganisms have not been added. From this result, a comparative analysis of the abiotic degradation of each sulfurous substrate was performed, as it was verified in the negative control samples (absence of microorganisms). It may be also noted, for the three different methodologies employed for detecting sulfate, that the abiotic degradation of sodium sulfide and sodium thiosulfate was significantly lower as compared to sodium sulfite (Fig. 1). The degree of stability of the sulfurous substrates showed the following order: sulfide > thiosulfate > sulfite ( $P < 0.05$ ).

(Figure 1 near here)

The strain *P. pantotrophus* ATCC 35512 showed potential for sulfate production under certain conditions, and this compound could be detected during cultivation on different sulfurous substrates. However, sulfate production by *P. pantotrophus* was only significantly different to the respective abiotic control when sodium thiosulfate was the substrate (Fig. 1). For the other two substrates (sodium sulfide and sodium sulfite), sulfate concentration reached similar values under both biotic and abiotic conditions, and the differences were not significant ( $P > 0.05$ ). This pattern was observed for the three methodologies tested. However, the biomass was

clearly higher for cultures containing either sodium thiosulfate or sodium sulfite (data not shown).

The similar patterns of sulfate production obtained by biotic and abiotic degradation obtained by three different methodologies indicates that the *P. pantotrophus* strain was only effective for the production of sulfate from sodium thiosulfate (Fig. 1). However, the sensitivity for sulfate detection was different among the methodologies. In Table 2, it can be seen that the average of the net production of sulfate from sodium thiosulfate biodegradation were similar when compared between two methodologies (spectrophotometry and AAS). On the other hand, the results obtained by ion chromatography (both the mean of the values for gross production of sulfate as the mean of the values for abiotic degradation) were more sensitive, being ion chromatography considered the best method to determine sulfate to the proposed objective.

(Table 2 near here)

#### **4. Discussion**

It was possible to observe a net production of sulfate by *P. pantotrophus* only from the conversion of sodium thiosulfate, once the thiosulfate is the most common oxidized substrate, being metabolized by a largely group of chemoautotrophic sulfur oxidizing bacteria and a considerable percentage of photoautotrophic prokaryotes [18]. Studies on sulfur-oxidizing bacteria, using *P. pantotrophus* as model microorganism, in order to determine their thiosulfate oxidation through the mechanisms of sox gene complex, are already described in the literature [23, 24, 25]. In addition, other sources of sulfur, such as sulfites, sulfides and elemental sulfur are also reported [26, 27]. However, studies to evaluate the production of sulfate through the thiosulfate are more common when compared to other intermediates of the sulfur cycle. For this study, the net production of sulfate from thiosulfate conversion in inorganic medium was relatively high compared to other strains (*Tetrathio bacter kashmirensis* and *Thiomicrospira crunogena*), which exhibited the same metabolic potential [28].

Differences in sulfate production were not observed when sodium sulfide or sodium sulfite were used as substrates. However, the potential of *P. pantotrophus* to convert these compounds to sulfate can not be ruled out, since the

inorganic media supplemented with sodium sulfide or sodium sulfite showed bacterial growth during the 9 days of incubation at 37°C. It is likely that sulfate could be produced from sodium sulfite by *P. pantotrophus*. However, the magnitude scales of sulfate production by the strain evaluated was similar to the negative control (abiotic degradation) probably causing overlapping of results, since the high abiotic degradation observed for sodium sulfite may be due to the high chemical instability of this compound. Due to the instability of the compounds, particularly sodium sulfite, sulfate production by the strain was not highlighted, even when it was measured by ion chromatography.

The results confirm that the three methods were reliable for determination of sulfate, as well as assist in the understanding of data generated for each converted substrate. However, the ion chromatography method was more sensitive. Many authors advocate the use of ion chromatography as standard compared to other analytical methods [29, 30, 31]. Compared to the classical method based on barium precipitation and the spectrophotometric method, the ion chromatography technique has shown more accurately, with higher specificity and sensitivity [32]. Morales et al. [30] emphasize that the ion chromatography method has become increasingly common to detect ions in environmental samples, due to the high accuracy and reliability, as well as being recognized by the US Environmental Protection Agency (EPA) as a method of choice for the determination of anions in natural water. However, the turbidimetric assay can be fundamental for samples with high concentrations of sulfate, being a robust method [33, 34], unlike the ion chromatography method in which samples should be well diluted.

## **5. Conclusions**

The strain *P. pantotrophus* ATCC 35512 was metabolically competent in sulfate production. It was possible to observe the sulfate conversion in the presence of inorganic medium supplemented with sodium thiosulfate. Although all of these methods have been useful to confirm the results obtained, the chromatographic method was the most sensitive for this study. In this context, the strain *P. pantotrophus* ATCC 35512 can be used as a reference standard for the study of microbial production of sulfate from sodium thiosulfate. These results can be useful to compare with sulfur oxidizing bacteria, prospected environmental samples of

wastewater treatment plants in order to compose a bacterial consortium potentially able to convert H<sub>2</sub>S into sulfate.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from CNPq and CAPES (Brasilia, Brazil).

### **References**

- [1] Zhang L, De Schryver P, De Gusseme B, De Muynck W, Boon N, Verstraete W. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer: a review. *Water Res.* 2007; 42: 1-12.
- [2] Rattanapan C, Boonsawang P, Kantachote D. Removal of H<sub>2</sub>S in down-flow GAC biofiltration using sulfide oxidizing bacteria from concentrated latex wastewater. *Bioresource Technol.* 2009; 100: 125-130.
- [3] Barton LL, Fauque GD. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Adv Appl Microbiol.* 2009; 68: 41-98.
- [4] Noyola A, Sagastume JMM, Hernandez JEL. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy resource recovery. *Environ Sci Technol.* 2006; 5: 93-114.
- [5] Ministério do Trabalho e Emprego. Norma regulamentadora número 15 [cited 2013 may 01]. Available from:  
[http://www.mte.gov.br/legislacao/normas\\_regulamentadoras/nr\\_15\\_anexo11.pdf](http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_15_anexo11.pdf).
- [6] Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA - Resolução nº 430/2011 [cited 2015 may 01]. Available from:  
[http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/propresol\\_lanceflue\\_30e31mar11.pdf](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/propresol_lanceflue_30e31mar11.pdf)
- [7] Dhar BR, Elbeshbishy E, Hafez E, Nakhla G, Ray MB. Thermo-oxidative pretreatment of municipal waste activated sludge for volatile sulfur compounds removal and enhanced anaerobic digestion. *Chem. Eng. J.* 2011; 174: 166-174.
- [8] Liu H, Luo G, Hu H, Zhang Q, Yang J, Yao H. Emission characteristics of nitrogen- and sulfur-containing odorous compounds during different sewage sludge chemical conditioning processes. *J Hazard Mater.* 2012; 235/236: 298-306.

- [9] Kantachote D, Innuwat W. Isolation of *Thiobacillus* sp. for use in treatment of rubber sheet wastewater. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2004; 26: 649-657.
- [10] Kantachote D, Charernjitrakul W, Noparatnaraporn N, Oda K. Selection of sulfur oxidizing bacterium for sulfide removal in sulfate rich wastewater to enhance biogas production. *Electron J Biotechnol*. 2008; 11: 107-118.
- [11] Kobayashi T, Li Y, Kubota K, Harada H, Maeda T, Yu H. Characterization of sulfide-oxidizing microbial mats developed inside a full-scale anaerobic digester employing biological desulfurization. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012; 93: 847-857
- [12] Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Bhakyaraj R. Sulphur oxidizing bacteria and pulse nutrition: a Review. *World J Agric Sci*. 2009; 5: 270-278.
- [13] Krishnani K K, Kathiravan V, Natarajan M, Kailasam M, Pillai SM. Diversity of sulfur-oxidizing bacteria in greenwater system of coastal aquaculture. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010; 162: 1225-1237.
- [14] Oh S E, Hassan SHA, van Ginkel SW. A novel biosensor for detecting toxicity in water using sulfur-oxidizing bacteria. *Sens Actuators, B*. 2011; 154: 17-21.
- [15] Tourova TP, Slobodova NV, Bumazhkin BK, Kolganova TV, Muyza G, Sorokin DY. Analysis of community of sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline and soda lakes using sox B as a functional molecular marker. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013; 84: 280-289.
- [16] Kappler U, Friedrich CG, Truper HG, Dahl C. Evidence for two pathways of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella* (formerly *Thiobacillus novellus*). *Arch. Microbiol*. 2001; 175: 102-111.
- [17] Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A, Fischer J. Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol*. 2005; 8: 253-259
- [18] Ghosh W, Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev*. 2009; 33: 999-1043.
- [19] Chung YC, Huang C. Removal of hydrogen sulphide by immobilized *Thiobacillus* sp. strain CH11 in a biofilter. *J Chem Technol Biotechnol*. 1997; 69: 58-62.
- [20] DSMZ. List of media. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb Germany; 2002.



- [21] Krug FJ, Bergamin Filho H, Zagatto EAG, Jørgensen SS. Rapid determination of sulfate in natural waters and plant digests by continuous flow injection turbidimetry. *Analyst* 1977; 102: 503-508.
- [22] Vieira-Filho MS, Pedrotti, JJ, Fornaro, A. Contribution of long and mid-range transport on the sodium and potassium concentrations in rainwater samples, São Paulo megacity, Brazil. *Atmos. Environ.* 2013; 79: 299-307.
- [23] Kelly DP, Shergill JK, Lu WP, Wood AP. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Anton Leeuw* 1997; 71: 95-107.
- [24] Friedrich CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A, Fischer J. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67: 2873-2882.
- [25] Sauve V, Bruno S, Berks BC, Hemmings AM. The soxYZ complex carries sulfur cycle intermediates on a peptide swinging arm. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 23194-23204.
- [26] Rainey FA, Kelly DP, Stackebrand E, Burghard J, Hiraishi A, Katayama Y, Wood AP. A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 2: 645-651.
- [27] Frigaard N, Dahl C. Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv Microb Physiol.* 2009; 54: 103-200.
- [28] Alam M, Pyne P, Mazumdar A, Peketi A, Ghosha W. Kinetic enrichment of 34S during proteobacterial thiosulfate oxidation and the conserved role of soxB in S-S bond breaking. *Appl Environ Microb.* 2013; 9: 4455-4464.
- [29] Karakaya A, Carter DE. High-performance liquid chromatography of glucuronide and sulfate conjugates using ion-pair chromatography. *J Chromatogr A.* 1980; 195: 431-434.
- [30] Morales JA, Graterol LS, Mesa J. Determination of chloride, sulfate and nitrate in groundwater samples by ion chromatography. *J Chromatogr A.* 2000; 884: 185-190.
- [31] Silveira ELC, Caland LB, Tubino M. Simultaneous quantitative analysis of the acetate, formate, chloride, phosphate and sulfate anions in biodiesel by ion chromatography. *Fuel.* 2014; 124: 97-101.

- [32] Cole DEC, Evrovski J. Quantitation of sulfate and thiosulfate in clinical samples by ion chromatography. *J Chromatogr A*. 1997; 789: 221-232.
- [33] Lundquist P, Martensson J, Sorbo B, Ohman S. Turbidimetry of inorganic sulfate, ester sulfate, and total sulfur in urine. *Clin. Chem*. 1980; 26: 1178-1181.
- [34] Sorbo B. Sulfate: turbidimetric and nephelometric methods. *Methods Enzymol*. 1987; 143: 3-6.

**Table 1.** Components for preparation for inorganic broth G, pH 7

Macronutrients <sup>a</sup>	Micronutrients (solution of trace elements) <sup>b</sup>
2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 g Na <sub>2</sub> EDTA
2.47 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	7.34 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
0.4 g NH <sub>4</sub> Cl	2.5 g MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
0.2 g MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O
0.01 g FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	11 g NaOH
8 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O, or Na <sub>2</sub> S, or Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	
2 g NaHCO <sub>3</sub>	
1 ml solution of trace elements <sup>b</sup>	

<sup>a,b</sup> Diluted to 1000 mL with ultrapure water (MilliQ)

**Table 2.** Net production of sulfate by *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 from different sulfur substrates and quantified by three different analytical methods

Substrate	Spectrophotometry	AAS	Ion chromatography
Sodium thiosulfate	428.2 <sup>a</sup> (684.02 <sup>b</sup> – 255.8 <sup>c</sup> )	348.9 (499.4 – 150.5)	1181.3 (1643.7 – 462.4)
Sodium sulfide	16.5 (51.5 – 35.1)	2.5 (161.6 – 159.0)	-12.8 (480.9 – 493.7)
Sodium sulfite	5.8 (698.8 – 693.0)	157.2 (1303.5 – 1146.3)	258.7 (6722.7 – 6464.0)

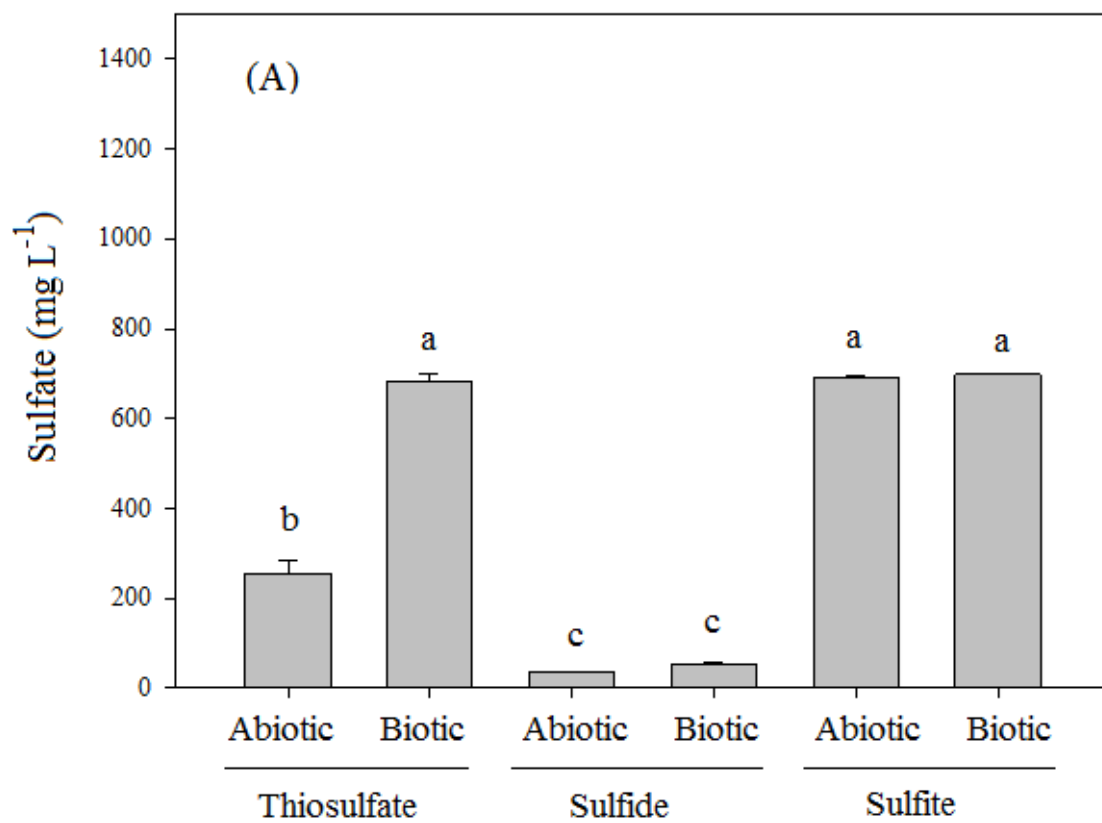
<sup>a</sup> average values for net production of sulfate by biodegradation (*P. pantotrophus*)

<sup>b</sup> average of the values for gross production of sulfate (abiotic + biotic degradation)

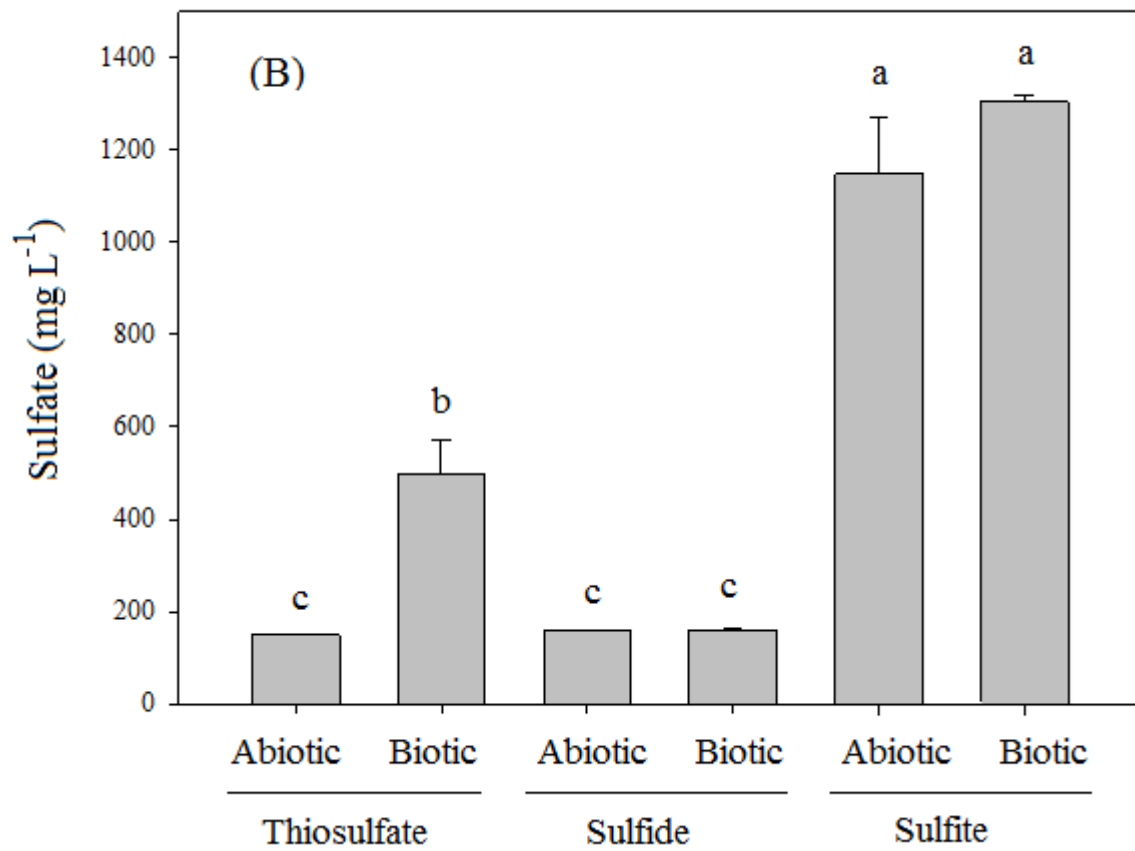
<sup>c</sup> average of the values for sulfate production by abiotic degradation

## Figure legends

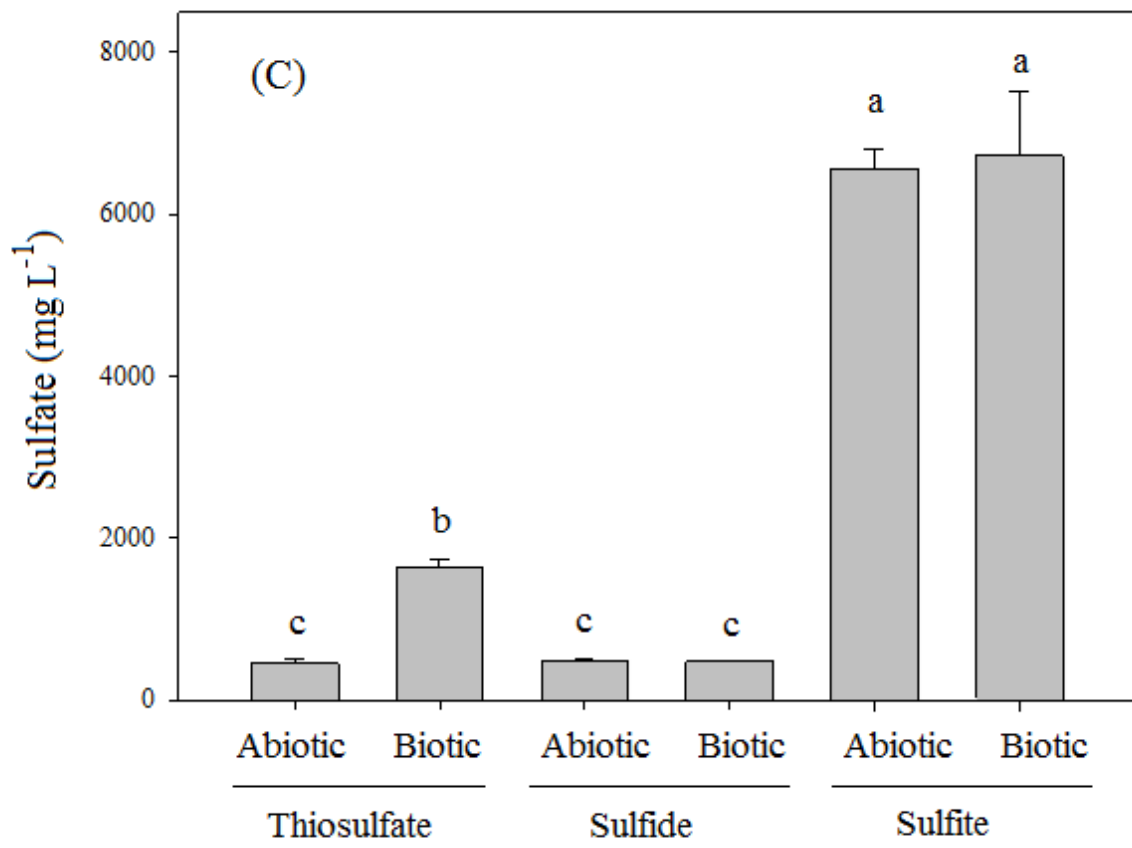
**Figure 1.** Sulfate production by *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 during cultivation in inorganic broth supplemented with sodium sulfide, sulfite or thiosulfate. Determination of sulfate was performed by (A) spectrophotometry, (B) atomic absorption spectrometry, or (C) ion chromatography. Bars are the means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. <sup>a, b, c</sup> Different letters indicate the values are significantly different by Tukey's test ( $P < 0.05$ ).



Meyer et al., Fig. 1A



Meyer et al., Fig. 1B



Meyer et al., Fig. 1C

## **5.2 Bacterial communities involved in sulfur transformations in wastewater treatment plants**

Daniel Derrossi Meyer<sup>a</sup>, Pedro Avelino Maia de Andrade<sup>b</sup>, Ademir Durrer<sup>b</sup>, Fernando Dini Andreote<sup>b</sup>, Gertrudes Corção<sup>a</sup>, Adriano Brandelli<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

\* Correspondence: Dr. A. Brandelli, ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brazil; Phone/fax: +5551 3308 7048; e-mail: [abrand@ufrgs.br](mailto:abrand@ufrgs.br)

## **Abstract**

The main sulfate reducing (SRB) and sulfur oxidizing bacteria (SOB) in six wastewater treatment plants (WWTPs) located at southern Brazil were described based on high-throughput sequencing of the 16S rDNA. Specific taxa of SRB and SOB were correlated with some abiotic factors, such as the source of the wastewater, oxygen content, sample type and physical chemical attributes of these WWTPs. When the 22 families of SRB and SOB were clustered together, the samples presented a striking distribution, demonstrating grouping patterns according to the sample type. For SOB, the most abundant families were *Spirochaetaceae*, *Chromatiaceae*, *Helicobacteriaceae*, *Rhodospirillaceae* and *Neisseriaceae*, whereas, for SRB, were *Syntrophaceae*, *Desulfobacteraceae*, *Nitrospiraceae* and *Desulfovibrionaceae*. The structure and composition of the major families related to the sulfur cycle were also influenced by six chemical attributes (sulfur, potassium, zinc, manganese, phosphorus and nitrogen). Sulfur was the chemical attribute that most influenced the variation of bacterial communities in the WWTPs ( $\lambda = 0.14$ ,  $p = 0.008$ ). The OTUs affiliated to *Syntrophus* showed the highest response to the increase of total sulfur. All these findings can contribute to improve the understanding in relation to the sulfur oxidizing and sulfate reducing communities in WWTPs aiming to reduce H<sub>2</sub>S emissions.

**Key-words:** Sulfate reducing bacteria; sulfur oxidizing bacteria; wastewater treatment plants; 16S rDNA gene



## Introduction

The growth of human population leads to an increasing production of effluents, demanding new technologies to reduce its environmental impact. In recent decades, the establishment of Wastewater Treatment Plants (WWTPs) became a common practice to debug both industrial and domestic liquid waste. However, some problems are related to WWTPs, for example, the release of gases like hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) (Zhang et al. 2007; Rattanapan et al. 2009).

The production of H<sub>2</sub>S derives from metabolic pathways present in sulfate reducing bacteria (SRB), activated under anaerobic conditions (Barton and Fauque 2009). These bacteria utilize sulfate as a final electron acceptor to obtain energy, resulting in the production of H<sub>2</sub>S. SRB mostly belong to the class *Deltaproteobacteria*, but they can be also found among *Nitrospirae*, *Clostridia*, *Thermodesulfobiaceae* and *Thermodesulfobacteria* (Muyzer and Stams 2008). Sulfur oxidizing bacteria (SOB) consume H<sub>2</sub>S, producing sulfur-oxidized compounds such as sulfides, elemental sulfur, sulfites and thiosulfates. These bacteria are chemoautotrophs and belong to *Proteobacteria* (classes  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -), *Chlorobia* and *Chloroflexi* (Friedrich et al. 2005; Ghosh and Dam 2009).

The communities of SRB and SOB have been described in several environments (Vidyalakshimi et al. 2009; Krishnani et al. 2010; Tourova et al. 2013; Varón-Lopez et al. 2014) where the concatenated activities of these groups are believed to sustain the S cycle, avoiding its release as H<sub>2</sub>S. However, the knowledge about SRB and SOB communities in WWTPs is a gap to be properly filled. It is believed that in WWTPs with distinct use, communities of SRB and SOB are composed by distinct groups and diverging in community assemblies (Pokorna and Zabranska 2015).

Most of studies about the diversity of SOB and SRB used functional genes, such as *soxB*, *dsrAB* and *aprAB*, as proxies to determine active microbial groups on S cycle (Meyer and Kuever 2007; Meyer et al. 2007; Luo et al. 2011; Tourova et al. 2013). However, these genes are less efficient to properly name the bacterial groups found in a given sample. The use of the 16S rRNA gene can solve it, supporting the classification and comparison of SRB and SOB communities across samples.

Moreover, high-performance next-generation sequencing (NGS) technologies allow robust depiction of the bacterial communities (Belila et al. 2013; Kim et al. 2013). This approach has been used to show the main families of SRB and SOB present in sludge or effluent samples, but detailed studies on the composition and structure of SOB and SRB communities in WWTPs are scarce (Xia et al. 2010; Ye and Zhang 2013).

Here we propose the description of the main SRB and SOB in six WWTPs distributed along the State of Rio Grande do Sul (Brazil). From these, two are used for industrial wastewater treatments and four are used to treat domestic effluents. Taxonomical inferences were based on the sequencing of the 16S rDNA by high-throughput sequencing, which were also used to correlate the occurrence of specific taxa of SRB and SOB with some abiotic factors, such as the source of the effluent oxygen content, sample type and physical and chemical attributes of these WWTPs. These data constitute the first step for the optimization of operation of WWTPs, aiming to control the emissions of H<sub>2</sub>S.

## **Materials and Methods**

### **WWTPs characterization and sampling procedures**

Samples were from six different Wastewater Treatment Plants (WWTPs) across the State of Rio Grande do Sul (Brazil) along June, 2013. From these, three samples were obtained from anaerobic bioreactors (PF, DE and BR), one from activated sludge (HU) and the other two were obtained from stabilization pond (BN LA and BN LF), resulting in 18 samples (3 replicates in 6 WWTPs) (Table 1). In each of these WWTPs, triplicate samples made of 1L of sludge or effluent (depending on use of WWTP) were obtained from 0 to 20 cm depth, stored and transported under sterilized polyethylene bottles to the laboratory.

Characterization of samples were made to determine pH, density, dry matter, total organic matter, amounts of total carbon, organic carbon, carbon/nitrogen ratio, total mineral residue, insoluble and soluble fractions, total nitrogen, total phosphorus, potassium, calcium, magnesium, total sulfur, copper, manganese, zinc and iron (Raij et al. 1997; EMBRAPA 1997) These analyses were performed at the Soil Fertility Laboratory, University of São Paulo (ESALQ/USP, Piracicaba, Brazil).

### **DNA extraction**

The DNA was obtained by extraction using PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc. Laboratories, USA), following the manufacturer's instructions. Aliquots of 1 mL of each sample were used to yield approximately 5.0 µg DNA. The DNA quality was evaluated by electrophoresis on a 1.0% agarose gel in TAE buffer (400 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA). The gel was stained in a solution of ethidium bromide and visualized under UV light.

### **Analysis of the bacterial communities by sequencing the V6 region of the 16S rRNA gene**

The target V6 region of the 16S rRNA gene was amplified from all 18 samples. The DNA was used for PCR with primers 967F and 1046R (Sogin et al. 2006) amended with adaptors. Each forward primer carried distinct 5-base tags (<http://vamps.mbl.edu/>), further used to separate sequences from each sample. The amplification conditions were determined for final volume of 25 µL reactions, comprising 1x PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> (2mM), dNTP (0.2 mM), each primer (0.304 mM) and *Taq Platinum* DNA polymerase (0.1 U µL<sup>-1</sup>). Amplification was promoted by an initial step of denaturation for 5 min at 94°C, followed by 25 cycles of denaturation in 94°C for 30 sec, annealing in 57°C for 45s, extension in 72°C for 60s, completed by a final extension at 72°C for 10 min. Afterwards, generated amplicons were purified with the kit Charge Switch PCR Clean UP (Invitrogen, USA) and subjected to sequencing by the Ion Torrent *Personal Genome Machine* (Life Technologies, USA) at the Environmental Microbiology Laboratory (Embrapa Environment, Jaguariúna, Brazil) as described previously (Kavamura et al. 2013). We used the kit V2 and the chip 316, yielding length reads of approximately 250 pb in an amount of 60 to 100 Mb. The raw sequence data were deposited in the MG-RAST Metagenomics Analysis Server under the accession number seq (271316).

Sequence analyses were carried out using QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al. 2010). The sequences were initially separated by samples according to their tags. Filtering of sequences was performed using a moving average Q20 cutoff, where sequences below this quality and containing less than 150 bp were discarded (Wang et al. 2007). The remaining sequences were

clustered and assigned to OTUs (Operational Taxonomic Units), determined by the identity of 97% using the “*Uclust*” method (Edgar 2010). Representative sequences for each OTU were further subjected to taxonomic analysis using the BLAST method against the Greengenes database (de Santis et al. 2006a), generating an OTU table. These sequences were also aligned by PyNAST algorithm to support phylogenetic inferences among OTUs (de Santis et al. 2006b). To avoid biases related to the heterogeneity of the number of sequences in each sample, the OTU table was rarified for 11,365 sequences per sample. The rarified data were then used to generate classification plots and to estimate ecological indices, such as diversity (Shannon) and richness (Chao1). The similarities between the bacterial community structure and composition were analyzed by a hierarchical cluster based in a *Wheighted-Unifrac* pairwise similarity matrix, using the algorithm UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Lozupone and Knight 2005), where the beta-diversity was used to compare samples using the OTU table generated. Firstly we compared the structure and composition of the whole bacterial community through a PCoA (principal coordinates analysis) and ANOSIM test of similarity. Afterwards, we selected from the literature 17 and 13 families, respectively, for SOB and SRB to perform this approach (Kaksonen 2004; Meyer et al. 2007). Then, the OTU table was filtered for the main taxonomic families related to sulfur oxidation and sulfate reduction. Therefore, we generated dendrograms (Andreote et al. 2009), using the algorithm of “Bray-Curtis” to compare the similarities of the composition of SRB, SOB or SRB+SOB communities among WWTPs.

The comparative results of the sampling points and between SOB and SRB groups were obtained by ANOVA to a confidence level of 95%, and if significant, the Tukey test (Table 3).

The correlation between SRB and SOB communities with environmental variables was made by multivariate analysis (Table 4). First, a detrended correlation analysis (DCA) was performed, revealing the linear distribution of the data for all targeted groups (sum of eigenvalues < 3.0). It elected the redundancy analysis (RDA) to explain correlations, supporting the significance of variables through the Monte Carlo permutation test (with 499 random permutations). The results of the Monte Carlo test generated information about the marginal effects of the environmental variables, quantifying the amount of variance explained by each factor

(Lambda 1). In addition, we generated response curves for parameters statistically correlated to variations in SRB and SOB. These analyses were carried out using Canoco 4.5 software (Vasquez-Baeza et al. 2013).

## **Results**

### **Differential characterization of the samples from WWTPs**

The six different WWTPs studied were classified according to the source of the wastewater, oxygen content and chemical physical attributes, in order to get information about the structure and composition of both total bacterial community as the main families related to the sulfur cycle. Four treatments (BN LA, BN LF, PF and HU) were obtained from domestic wastewater and the remaining samples (BR and DE) were collected from industrial wastewater (Table 1). In addition, oxygen content into the system was also an important factor to classify the different samples, categorized into three different levels: low or absent (+: BR, DE, PF), medium (+: BN LA, BN LF) and high (+++: HU). The chemical physical attributes obtained are summarized in Table 2. The highest total sulfur was detected in PF ( $0.34 \text{ g L}^{-1}$ ) and, in the sample BR, the highest values were observed for eight chemical physical attributes (potassium, zinc, nitrogen, phosphorus, copper, iron, calcium and magnesium). However, the lowest values were found for the BN samples (Table 2). The chemical physical attributes exhibit lower concentrations for stabilization ponds, since these samples were obtained from the effluent, whereas the remainder (BR, DE, PF and HU) were from biological sludge.

### **SOB and SRB community structure and composition**

A total 318,247 accurate sequences of 16S rRNA gene were obtained. After trimming and normalizing, 204,518 valid sequences remained. Using this normalized Operational Taxonomic Units (OTUs) table (11,365 sequences for sample), data was subjected to a PCoA (principal coordinates analysis). From this analysis, it can be observed that the bacterial community structure might be specific to each sample type ( $R= 0.99$ ;  $p= 0.001$ ) and source of the wastewater ( $R= 0.86$ ;  $p= 0.001$ ). Although a low correlation was found for oxygen content, the samples shared some bacterial groups ( $R= 0.55$ ;  $p= 0.001$ ) (Fig. 1).

In a distinct point of view, the ratio of the SRB and SOB families over the total

bacterial diversity was measured. In this context, we observed representative richness values to the SRB and SOB community over the total bacterial community. The percentages of the richness to the community of SOB in relation to total community were 0.012 (BR), 0.014 (DE), 0.024 (PF), 0.031 (HU), 0.053 (BN LA) and 0.039 (BN LF). The same parameters for the SRB community were 0.043 (BR), 0.046 (DE), 0.084 (PF), 0.015 (HU), 0.038 (BN LA) and 0.022 (BN LF). Moreover, when the absolute richness between the two predominant groups related to the sulfur cycle was considered, SOB and SRB species presented higher values in samples of activated sludge and anaerobic bioreactors, respectively (Table 3). In overall, a significantly higher richness of the SOB in the domestic wastewater (BN LA, BN LF and HU) and a higher richness of the SRB in the industrial and domestic wastewater (BR, DE and PF) was observed. Further, it is important to consider that in general, the SOB families presented lower relative abundance in relation to SRB families (Table 3).

The structure and composition of the SRB and SOB families over the total bacterial diversity was analyzed. In general, a clear difference of the SOB community was observed between industrial and domestic effluents. In this context, we could also observed that the bacterial community structure, in the industrial effluents, was mainly dominated the family *Spirochaetaceae* (BR = 98%; DE = 81%). On the other hand, the domestic effluents revealed a higher richness (observed species OTU) in relation to industrial effluent (Table 3) and the SOB community was mostly represented by the families *Chromatiaceae* (20.8%), *Helicobacteraceae* (11.3%), *Rhodospirillaceae* (10.9%) and *Neisseriaceae* (8.9%) (Fig. 2A).

Considering the SRB community, we observed that the families were structured by the anaerobic bioreactor in detriment of the aerobic ponds, with the higher abundance of *Syntrophaceae* (BR = 58%; DE = 69%; PF = 37%). In contrast the aerobic pond, anaerobic bioreactors presented a higher richness (Table 3). On the other hand, more oxygenated environments (HU, BN LA and BN LF) were mainly dominated by *Desulmobiaceae* (14.4%), *Desulfobacteriaceae* (13%), *Nitrospiraceae* (12.6%) and *Desulfovibrionaceae* (12.3%) (Fig. 2B).

The relative frequency patterns of the SOB and SRB families was estimated according to Fig. 2C. BR samples showed a higher abundance of *Syntrophaceae* (36%) and *Spirochaetaceae* (40%). The same pattern was observed to DE samples:

*Syntrophaceae* (59%) and *Spirochaetaceae* (11.5%). The PF samples demonstrated a relative frequency of *Syntrophaceae* (32%), however presented low abundance of *Spirochaetaceae* (0.6%). On the other hand, the samples from the stabilization ponds were separated from others, represented by the relative frequency of the bacterial groups involved. In this context, there was a high abundance of *Chromatiaceae* for both BN LF (68%) and BN LA (24%). In addition, two other families, *Helicobacteriaceae* (17%) and *Desulfobacteriaceae* (21%), presented expressive relative values to BN LA. Finally, it was observed a higher abundance of *Nitrospiraceae* (46%) and *Rhodospirillaceae* (16%) in HU (Fig. 2C). In relation to the patterns of distribution, SOB community presented a grouping pattern for sample types. Samples of two anaerobic bioreactors (BR and DE) presented higher similarity. A similar grouping pattern also occurred with the samples from the two stabilization ponds (Fig. 2A). Considering the SRB community, the three samples collected from anaerobic bioreactor (BR, DE and PF) formed a single group. Even with the distinctive features of each WWTPs, the composition and structure of the SRB community remained similar (Fig. 2B). This did not occur with BN LA and BN LF, even though two different samples of stabilization pond showed similar chemical and physical attributes to each other (Table 2 and Fig. 2B). However, when the 22 families of SRB and SOB were clustered together, the samples presented a striking distribution, demonstrating grouping patterns according to the sample type (Fig. 2C). The three samples of anaerobic bioreactors (BR, PF and DE) were grouped together, showing a unique pattern of similarity. The samples of two stabilization ponds (BN LA and BN LF) also formed the same cluster pattern and, finally, the samples from activated sludge (HU) formed an outgroup, distinguishing three different patterns in total (Fig. 2C).

### **Correlation between environmental variables and communities of SRB and SOB**

According to RDA analysis, it was observed that some physical or chemical characteristics of the effluent samples were distinct for both communities (SOB and SRB). Sulfur ( $p=0.008$ ), potassium ( $p=0.002$ ), zinc ( $p=0.006$ ), manganese ( $p=0.002$ ), total nitrogen ( $p=0.01$ ) and total phosphorus ( $p=0.038$ ), contributed to the change in composition and structure of the main families related to the sulfur cycle. The

variables with higher values of Lambda1 for SRB and SOB were 0.14 (S), 0.10 (K), 0.08 (Zn), 0.08 (Mn), 0.08 (N) and 0.06 (P) (Table 4). Besides, a sample from anaerobic bioreactor (BR) showed higher values for these variables (Table 2). The negatives correlations are cited in the Table 4.

A response curve was constructed on the total amount of sulfur whose variable showed higher values of Lambda1 (0.14;  $p = 0.008$ ) to explain variation in the composition of SRB and SOB communities (Table 4 and Fig. 2C). Among the lot of OTUs evaluated from the response curve, three (2032, 438 and 7333, affiliated to *Syntrophus*, *Syntrophus* and *Desulfomicrobium*, respectively) presented positive correlation with the concentrations of total sulfur (Fig. 3). The two detected genus belong to the group of SRB. The presence and amount of sulfur found in the sample only changed the composition and structure of SRB communities. No alteration occurred to the genus of SOB.

## Discussion

The total bacterial community was specified according to each WWTP, since it was influenced by three different factors: the source of wastewater (domestic and industrial), oxygen content in the system and sample type according to Fig. 1. This trend was also observed for the sulfur cycle community (SOB and SRB). Thus, SOB community showed greater richness in domestic wastewater. This probably occurred because this kind of effluent is constituted by a mixture of organic compounds that is more variable both spatially and temporally in comparison to the source of industrial origin. The domestic wastewater may present since feces, pathogenic microorganisms, food waste until antibiotics, hormones and detergents. On the other hand, industrial effluents present, in general, mixtures more defined and homogeneous, depending on the production system and the nature of the feedstock, which can generate organic and inorganic components of different levels of toxicity (Henze et al 2002). On the other hand, greater richness was found in anaerobic bioreactor in related to the SRB community, demonstrating that both the type of sample and the amount of oxygen may be important to modulate the distribution of this community in the system. Finally, the richness of SOB communities was higher as the oxygen content increased. However, for SRB communities, this tendency was inversely proportional (Fig. 1 and Table 3). Therefore, when the SOB and SRB groups were



brought together by similarity (Fig. 2C), it is possible that the oxygen content present in each sampling point have helped to define the patterns of similarity between samples. Considering the richness of SOB and SRB, it is likely that the number of OTUs in the community was related to the presence and amount of available oxygen in the environment (Table 3). Thus, increasing the amount of dissolved oxygen in the system may have contributed to determine the increase in richness of SOB in detriment of SRB, and, for this study, in anoxic environments, the richness of SRB was generally higher (Table 3). According to Kantachote and Innuwat (2004), high levels of sulfide are produced due to the use of sulfate as final electron acceptor in anoxic conditions. Moreover, the H<sub>2</sub>S oxidation system is dependent on the concentration of oxygen (Gonzalez-Sanchez et al. 2005). Although SRB are restricted to anaerobic environments, researchers found that certain species of SRB tolerate not only the presence of oxygen, but also use it as a final electron acceptor during the process of respiration (Sigalevich and Cohen 2000; Jonkers et al. 2005). In this context and confirming the theory of the authors above, many OTUs from sulfate-reducing bacteria were also found in places quite oxygenates, as in HU sample, even to a lesser richness. Another important factor that probably contributes to the formation of similarity clusters was the set of physical and chemical parameters associated with the engineering system whose peculiarity characterizes each sample type (bioreactors, activated sludge system and stabilization ponds). Therefore, all the attributes mentioned can act as important environmental factors that cause of selective pressure on the communities, besides the biotic factors such as antagonistic and synergistic ecological relationships can also help characterize the given communities (Bell et al. 2013).

As well as the total bacterial community, many of the SOB and SRB families have also undergone changes in their distribution, mainly generated by different factors (source of wastewater, oxygen content and sample type) associated with six physical-chemical attributes (sulfur, potassium, zinc, manganese, phosphorus and nitrogen). These parameters may have influenced the community both individually and in a combined manner, potentially leading to different situations of synergism and/or antagonism. Therefore, although it is likely that the SOB community has been influenced by various abiotic factors, it is clear depicted in Fig. 2A the separation of two clusters according to the type of effluent that each WWTPs generates (industrial

or domestic). In relation to the oxygen content, the *Rhodospirillaceae* and *Hyphomicrobiaceae* families deserve attention, since the amount of oxygen in the system had a direct relationship with the abundance of both (Fig. 2A and Table 3).

On the other hand, for the SRB community, the oxygen content and the type of sample appear to be the most obvious parameters for the alteration of its distribution. In this context, *Syntrophaceae* and *Desulfovibrionaceae* families had higher abundance in samples with low oxygen levels. It was also observed that *Desulfomicrobiaceae* family had an opposite behavior. Since the richness of the family does not suffer abrupt variation among different samples, may be they are more resilient in different environments, unlike the SOB community. Moreover, many physical and chemical attributes evaluated seem responsible for the change in SOB and SRB communities, especially when considering the samples from anaerobic bioreactors and stabilization ponds (Fig. 2A and 2B; Table 4). However, a clear change on the composition and structure of these communities was not observed for the anaerobic bioreactor BR, even this sample presented high values for the chemical physical attributes (Fig. 2A and 2B; Table 2). Finally, the results from Fig. 2C support the hypothesis that the two communities (SRB and SOB) have a strong relation with each other, due to their participation in the sulfur metabolism in these WWTPs. The association among the various samples type was more defined when the 22 families were included in the analysis as compared to the groups obtained in Fig. 2A and 2B, since all mentioned abiotic factors tend to combine, highlighting these groups (Fig. 2C).

Recently, studies about distribution and diversity of bacterial communities in WWTPs have been developed (Arroyo et al. 2010; Luo et al. 2011; Kim et al. 2013; Belila et al. 2013). However, works related to the composition and structure of SOB and SRB are restricted (Mohanakrishnan et al. 2010; Xia et al. 2010; Ye and Zhang 2013). Regarding the main SRB families found in stabilization ponds in this study, *Desulfobacteriaceae*, *Desulfobulbaceae*, *Desulfomicrobiaceae*, *Syntrophaceae* and *Syntrophobacteriaceae* were also reported in samples from bioreactors used in wastewater treatment (Luo et al. 2011) and most of these families were detected in anaerobic bioreactors of effluent treatment systems (Mohanakrishnan et al. 2011). In addition to these major SRB families, *Rhodobacteriaceae*, *Chromatiaceae*, *Chlorobiaceae* and *Chloroflexaceae* were also detected by marker genes in

wastewater stabilization ponds periodically affected by the 'red-water' phenomenon (Belila et al. 2013). Concerning *Nitrospiraceae* family, although it did occur in a great abundance in the activated sludge sample (HU), few species of this taxonomic category play a role as sulfate reducing bacteria, since this family presents a very heterogeneous group in physiological terms, and its main genera are *Nitrospira* (nitrite-oxidizing bacteria), *Leptospirillum* (ferrous iron oxidizers) and *Thermodesulfovibrio* (sulfate-reducing bacteria) (Daims 2014). These results can also be confirmed from the phylogenetic analysis based in accordance with the sequences of rRNA of SRB species (Muyzer and Stams 2008).

The data generated by the richness and abundance of the OTUs of the main SOB and SRB families reinforce the idea that both groups have an important role in the sulfur cycle in these systems, independently of the source of effluent or sample type. Moreover, according to Luo et al. (2011), using primers for the marker genes (*dsrAB*, *soxB* and *sqr*), the SOB community responsible for removal of H<sub>2</sub>S in anaerobic bioreactors has not been altered throughout their entire study period, which was one year. However, in the present study, a high percentage of less abundant SOB families (0 - 0.1%) in relation to total bacterial community was found. It should also be considered that to families detected according to Fig. 2A, not all species (OTUs) are SOB, which supports the conclusion that the number of functional OTUs is rarer than it seems (especially to *Neisseriaceae* and *Spirochaetaceae*). According to a study of bacterial communities in bioreactors, the richness of OTUs showed a pattern of fluctuation for the rare taxa over almost two years, while taxa with greater abundance showed a relatively constant pattern over time (Kim et al. 2013). Although SOB group perform a unique ecological function for the sulfur cycle, these taxa may fluctuate over time, or even disappear if there are abrupt changes in the environmental conditions of the system, since problems with the operational dynamics are common in WWTPs (Comas et al. 2008). Although both SOB and SRB communities are important to the performance and balance of the sulfur cycle in these systems, SOB may be less effective to control H<sub>2</sub>S emissions in the effluent treatment systems since they are more rare and likely to present increased difficulty of reproducing in significant amounts over time. A likely explanation for these results is that SOB communities may present a higher demand for abiotic conditions such as the presence and the amount of oxygen and other

nutrients. They also can be more sensitive to environmental changes, such as in situations of loading shock in wastewater treatment in which changes occur in the physical-chemical pattern of the system (Pokorna and Zabranska 2015). Other parameters that can contribute to SOB populations remain in low percentages in the community are the competition and predation, presenting thus slow population growth compared to the SRB communities.

Finally, to establish a profile of the sulfur cycle communities, a response curve in relation to the amount of sulfur present in the samples was constructed, because it was the most influential constituent in changing the SRB and SOB communities (Fig. 3, Table 4). Among the numerous OTUs analyzed, only two genera showed a positive correlation, *Syntrophus* and *Desulfomicrobium*, belonging to *Syntrophaceae* and *Desulfomicrobiaceae* families, respectively. The first was found in all samples, and it was the most abundant family in the three anaerobic bioreactors (BR, DE, PF). The *Desulfomicrobiaceae* family, besides also be present in all samples, was the predominant family in the sample BN LF and the second most abundant in BN LA. Both genera belonging to the SRB group were also detected in other studies, as in activated sludge (Ye and Zhang 2013) and stabilization ponds (Belila et al. 2013). Moreover, it is likely that an amount of available sulfur in the samples has been presented in the oxidized form of sulfate. It is suggested, therefore, that the genus *Syntrophus* (*Syntrophaceae*) grew better at higher amounts of sulfur, at the same time it presented most tolerance to large variations of the nutrient in the environment, since the *Syntrophaceae* family was more abundant in samples of anaerobic bioreactors and their sulfur ranged from 0.02 to 0.34 g L<sup>-1</sup> (Table 2). Although there are two OTUs the same genre (*Syntrophus*), the comparison of the response curve between them is different. Thus, it is likely that these two OTUs are of different species. However, we only reached the genus level in terms of taxonomic classification. The genus *Desulfomicrobium* (*Desulfomicrobiaceae*) probably developed in smaller amounts of sulfur, since the correlation curve showed a smooth slope (Fig. 3). Thus, for both stabilization ponds, the values of total sulfur presented variation from 0.03 to 0.05 g L<sup>-1</sup>, while the *Desulfomicrobiaceae* family was more prevalent in these same sampling points when the abundance were compared with samples of activated sludge and anaerobic bioreactors.

In conclusion, molecular analysis of the total bacterial community, using the 16S rDNA gene, was satisfactory to show fluctuation of the main SRB and SOB families in relation to structure and composition in different communities from WWTPs. In addition, four abiotic factors (source of the wastewater, oxygen content, type of sample and chemical physical attributes) were important to modulate not only distribution in relation to the total bacterial community, but also in relation to the sulfur cycle community in the WWTPs analyzed. Besides that, the group of SOB was rarer than SRB, both in the number of species and in percent of families of low abundance. Briefly, all these findings can contribute to improve the understanding in relation to the sulfur oxidizing and sulfate reducing communities in WWTPs, as well as help to define, in future studies, effective strategies to control emissions of H<sub>2</sub>S in systems with similar logistics. The presence of a high percentage of low abundance SOB families allows to suggest strategies that contribute to the population growth of this group in the community, either by adding pre-selected consortia (bioaugmentation) or by use of techniques that favor its development (biostimulation) or their combinations, as well as specific techniques that restrict the growth of the SRB community in the systems.

### **Acknowledgments**

The authors thank CAPES for awarding the research grant to D.D. Meyer and FAPESP for providing financial resources for the development of this research.

### **Conflict of interest**

Authors declare no conflicts of interest.

### **Ethical approval**

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

### **References**

- Andreote FD, Azevedo JL, Araújo WL (2009) Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Braz J Microbiol* 40: 417-432. doi: 10.1590/s1517-83822009000300001
- Arroyo P, Ansola G, Blanco I, Molleda P, Calabuig EL, Sáenz de Miera LE (2010) Comparative analysis of the composition of bacterial communities from two constructed wetlands for municipal and swine wastewater treatment. *J Water Health* 8: 147-157. doi: 10.2166/wh.2009.123
- Barton LL, Fauque GD (2009) Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Adv Appl Microbiol* 68: 41-98. doi: 10.1016/s0065-2164(09)01202-7
- Belila A, Abbas B, Fazaa I, Saidi N, Snoussi M, Hassen A, Muyzer G (2013) Sulfur bacteria in wastewater stabilization ponds periodically affected by the 'red-water' phenomenon. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 379-394. doi:10.1007/s00253-012-3931-5
- Bell TH, Callender KL, Whyte LG, Greer CW (2013) Microbial competition in polar soils: a review of an understudied but potentially important control on productivity. *Biology* 2: 533-554. doi: 10.3390/biology2020533
- Caporaso G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello DK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335-336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
- Comas J, Rodríguez-Roda I, Gernaey KV, Rosen C, Jeppsson U, Poch M (2008) Risk assessment modelling of microbiology-related solids separation problems in activated sludge systems. *Environ Model Softw* 23: 1250 – 1261. doi:10.1016/j.envsoft.2008.02.013
- Daims H (2014) The family Nitrospiraceae. In: Rosenberg E (ed) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, pp. 230 - 257
- de Santis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006a) Greengenes, a chimera-checked 16s rRNA gene

- database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069-5072. doi:10.1128/AEM.03006-05
- de Santis TZ, Hugenholtz P, Keller K, Brodie EL, Larsen N, Piceno YM, Phan R, Andersen GL (2006b) NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16s rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 34: W394-W399. doi: 10.1093/nar/gkl244
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
- EMBRAPA (1997) Manual de métodos de análises de solo. Rio de Janeiro
- Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A, Fischer J (2005) Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol* 8: 253-259. doi: 10.1002/9780470015902.a0021155
- Ghosh W, Dam B (2009) Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 33: 999-1043. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00187.x
- Gonzalez-Sanchez A, Alcantara S, Razoflores E, Revah S (2005) Oxygen transfer and consumption in a thiosulfate oxidizing bioreactor with sulfur production. *Lett Appl Microbiol* 41: 141-146. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01741.x
- Henze M, Harremoës P, Jansen JC, Arvin E (2002) *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg
- Jonkers HM, Koh IO, Behrend P, Muyzer G, de Beer D (2005) Aerobic organic carbon mineralization by sulfate-reducing bacteria in the oxygen-saturated photic zone of a hypersaline microbial mat. *Microb Ecol* 49: 291-300. doi: 10.1007/s00248-004-0260-y
- Kaksonen A (2004) The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed reactors treating acidic metal - and sulfate - containing wastewater. Ph.D. thesis. Tampere University of Technology
- Kantachote D, Innuwat W (2004) Isolation of *Thiobacillus* sp. for use in treatment of rubber sheet wastewater. *Songklanakarin J Sci Technol* 26: 649-657
- Kavamura VN, Taketani RG, Lançon MD, Andreote FD, Mendes R, Melo IS (2013) Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. *PLoS ONE* 8: e73606, doi: 10.1371/journal.pone.0073606

- Kim TS, Jeong JY, Wells GF, Park HD (2013) General and rare bacterial taxa demonstrating different temporal dynamic patterns in an activated sludge bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 1755-1765. doi: 10.1007/s00253-012-4002-7
- Krishnani KK, Kathiravan V, Natarajan M, Kailasam M, Pillai SM (2010) Diversity of sulfur-oxidizing bacteria in greenwater system of coastal aquaculture. *Appl Biochem Biotechnol* 162: 1225-1237. doi: 10.1007/s12010-009-8886-3
- Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71: 8228 – 8235. doi:10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
- Luo JF, Lin WT, Guo Y (2011) Functional genes based analysis of sulfur-oxidizing bacteria community in sulfide removing bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 769-778. doi: 10.1007/s00253-010-3061-x
- Meyer B, Kuever J (2007) Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology* 153: 3478-3498. doi: 10.1099/mic.0.2007/008250-0
- Meyer B, Imhoff JF, Kuever J (2007) Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environ Microbiol* 9: 2957-2977. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01407.x
- Mohanakrishnan J, Kofoed MV, Barr J, Yuan Z, Schramm A, Meyer RL (2011) Dynamic microbial response of sulfidogenic wastewater biofilm to nitrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 1647-1657. doi: 10.1007/s00253-011-3330-3
- Muyzer G, Stams AJM (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Microbiol Rev* 6: 441-454. doi: 10.1038/nrmicro1892
- Pokorna D, Zabranska J (2015) Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnol Adv* 33: 1246-1259. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.007
- Raij BV, Andrade JC, Cantarela H, Quaggio JA (1997) Análise química para avaliação da fertilidade dos solos tropicais. Instituto Agrônomo, Campinas
- Rattanapan C, Boonsawang P, Kantachote D (2009) Removal of H<sub>2</sub>S in down-flow GAC biofiltration using sulfide oxidizing bacteria from concentrated latex



- wastewater. *Bioresource Technol* 100: 125-130. doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.049
- Sigalevich P, Cohen Y (2000) Oxygen-dependent growth of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* in coculture with *Marinobacter* sp strain MB in an aerated sulfate-depleted chemostat. *Appl Environ Microbiol* 66: 5019-5023. doi: 10.1128/AEM.66.11.5019-5023.2000
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 12115-12120. doi: 10.1073/pnas.0605127103
- Tourova TP, Slobodova NV, Bumazhkin BK, Kolganova TV, Muyza G, Sorokin DY (2013) Analysis of community of sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline and soda lakes using *soxB* as a functional molecular marker. *FEMS Microbiol Ecol* 84: 280-289. doi: 10.1111/1574-6941.12056
- Varón-Lopez M, Dias ACF, Fasanella CC, Durrer A, Melo IS, Kuramae EE, Andreote FD (2014) Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. *Environ Microbiol* 16: 845-855. doi: 10.1111/1462-2920.12237
- Vazquez-Baeza Y, Pirrung M, Gonzalez A, Knight R (2013) Emperor: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience* 2: 1-16. doi: 10.1186/2047-217X-2-16
- Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Bhakayaraj R (2009) Sulphur oxidizing bacteria and pulse nutrition: a Review. *World J Agric Sci* 5: 270-278.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261-5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07
- Xia S, Duan L, Song Y, Li J, Piceno MY, Andersen GL, Alvarez-Cohen L, Moreno-Andrade I, Huang CL, Hermanowicz SW (2010) Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors. *Environ Sci Technol* 44: 7391-7396. doi: 10.1021/es101554m
- Ye L, Zhang T (2013) Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 2681-2690. doi: 10.1007/s00253-012-4082-4

Zhang L, de Schryver P, de Gusseme B, de Muynck W, Boon N, Verstraete W (2007)  
Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in  
sewer: a review. *Water Res* 42: 1-12. doi:10.1016/j.watres.2007.07.013

**Table 1.** Main WWTPs sample characteristics

Code	Source of wastewater	Sample type	City	Latitude (S)	Longitude (W)
		Anaerobic Pond (6 m) (LA)			
BN	Domestic	Facultative Pond (2.5 m) (LF)	Porto Alegre, RS, Brazil	30° 12' 34,53"	51° 10' 36,435"
HU	Domestic	Activated Sludge	Porto Alegre, RS, Brazil	29° 59' 20,382"	51° 11' 41,238"
PF	Domestic	Sludge from the anaerobic bioreactor	Passo Fundo, RS, Brazil	28° 15' 57,476"	52° 23' 35,733"
DE	Industrial	Sludge from the anaerobic bioreactor	Lajeado, RS, Brazil	29° 30' 54,050"	52° 0' 21,229"
BR	Industrial	Sludge from the anaerobic bioreactor	Lajeado, RS, Brazil	29° 27' 20,467"	51° 57' 47,942"

**Table 2.** Physical and chemical characteristics of environmental samples collected from six WWTPs.

Physical and chemical characteristics	WWTPs*					
	BR	DE	PF	HU	BN LA	BN LF
Sulfur (S) (g L <sup>-1</sup> ) †	0.27	0.02	0.34	0.02	0.03	0.05
Potassium (K <sub>2</sub> O) (g L <sup>-1</sup> ) †	1.68	0.42	0.05	0.03	0.02	0.02
Total Zinc (mg L <sup>-1</sup> ) †	8.66	2.00	5.33	6.66	4.66	2.00
Total Manganese (mg L <sup>-1</sup> ) †	53.33	12.33	83.33	47.00	4.00	4.33
Total Nitrogen (g L <sup>-1</sup> ) †	3.5	0.51	0.82	0.26	0.23	0.26
Total Phosphorus (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (g L <sup>-1</sup> ) †	4.83	0.07	0.18	0.09	0.03	0.03
pH	7.3	7.2	6.53	6.6	6.6	6.9
Total Copper (mg L <sup>-1</sup> )	4.33	1.33	2.33	1.00	1.00	1.00
Effluent Density (g cm <sup>-3</sup> )	1.02	1.00	0.98	0.98	0.96	0.94
Total Iron (mg L <sup>-1</sup> )	30.66	7.66	11.66	2.33	1.00	1.00
Total Mineral Residue (g L <sup>-1</sup> )	16.94	1.21	6.82	2.54	0.39	0.56
Soluble Mineral Residue (g L <sup>-1</sup> )	15.6	1.16	4.08	2.35	0.36	0.56
Dry Residue (100 -110°C) (g mL <sup>-1</sup> )	296.66	230.84	265.69	210.60	71.86	53.21
Insoluble Mineral Residue (g L <sup>-1</sup> )	1.34	0.05	2.74	0.18	0.03	0.01
Calcium (g L <sup>-1</sup> )	3.38	0.78	0.68	0.69	0.67	0.69
C/N ratio	44.66	248.66	195	443.66	171.33	113.66
Organic Carbon (g L <sup>-1</sup> )	149.63	122.66	140	113	35.74	25.33
Total Organic Matter (g L <sup>-1</sup> )	279.72	229.63	258.86	208.06	71.47	52.64
Total Carbon (g L <sup>-1</sup> )	155.40	127.57	143.81	115.68	39.86	29.51
Magnesium (g L <sup>-1</sup> )	0.36	0.07	0.06	0.02	0.01	0.02

\* Values are the average of triplicate determinations.

† Attributes that contribute to alterations in the SRB and SOB communities.

**Table 3.** Community structure of WWTP

Community Profile	BR	DE	PF	HU	BN LA	BN LF
Total richness of the total bacterial community (OTU)	1188 <sup>c</sup>	1358 <sup>b</sup>	1480 <sup>b</sup>	2135 <sup>a</sup>	1033 <sup>cd</sup>	991 <sup>d</sup>
Relative richness of SOB (OTU)	15 <sup>bc</sup>	19 <sup>bc</sup>	36 <sup>bb</sup>	67 <sup>Aa</sup>	55 <sup>Aa</sup>	39 <sup>Ab</sup>
Relative richness of SRB (OTU)	52 <sup>Ad</sup>	63 <sup>Ad</sup>	121 <sup>Aa</sup>	33 <sup>bb</sup>	40 <sup>bb</sup>	22 <sup>bb</sup>
Oxygen content	+	+	+	+++	++	++
Total abundance of 14 SOB families (%)*	2.23	0.86	2.76	1.63	5.30	3.94
Total abundance of 8 SRB families (%)*	3.76	5.56	12.93	2.30	3.80	0.63
Percentage of SOB families with low abundance (0 – 0.1%)*	94.11	94.11	76.46	78.42	78.58	80.44
Percentage of SRB families with low abundance (0 – 0.1%)*	50	50	25	75	42	83
Percentage of the most abundant SOB family*	2.20	0.73	1.93	0.56	2.30	3.46
Percentage of the most abundant SRB family*	2.23	3.96	7.90	1.70	1.96	0.26
Most abundant SOB family	A†	A	B	C	D	D
Most abundant SRB family	E	E	E	F	G	H

\* Relative to the total bacterial community (16S)

<sup>abcde</sup> Superscript letters indicate that values are significantly different ( $p < 0.05$ ) among WWTP

<sup>AB</sup> Superscript letters indicate that values are significantly different ( $p < 0.05$ ) between SOB and SRB

† A, *Spirochaetaceae*; B, *Helicobacteraceae*; C, *Rhodospirillaceae*; D, *Chromatiaceae*; E, *Syntrophaceae*; F, *Nitrospiraceae*; G, *Desulfobacteraceae*; H, *Desulfomicrobiaceae*

**Table 4.** Values of Lambda1 for communities of the sulfur cycle (SOB and SRB)

Physical and chemical characteristics	Lambda	<i>P</i> value
Sulfur (S) (g L <sup>-1</sup> )*	0.14	0.008
Potassium (K <sub>2</sub> O) (g L <sup>-1</sup> )*	0.10	0.002
Total Zinc (mg L <sup>-1</sup> )*	0.08	0.006
Total Manganese (mg L <sup>-1</sup> )*	0.08	0.002
Total Nitrogen (g L <sup>-1</sup> )*	0.08	0.010
Total Phosphorus (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (g L <sup>-1</sup> )*	0.06	0.038
pH	0.05	0.246
Total Copper (mg L <sup>-1</sup> )	0.05	0.288
Effluent Density (g cm <sup>-3</sup> )	0.04	0.380
Total Iron (mg L <sup>-1</sup> )	0.05	0.356
Total Mineral Residue (g L <sup>-1</sup> )	0.04	0.418
Soluble Mineral Residue (g L <sup>-1</sup> )	0.04	0.382
Dry Residue (100 -110°C) (g mL <sup>-1</sup> )	0.05	0.348
Insoluble Mineral Residue (g L <sup>-1</sup> )	0.03	0.444
Calcium (g L <sup>-1</sup> )	0.04	0.384
C/N ratio	0.04	0.486
Organic Carbon (g L <sup>-1</sup> )	0.03	1.000
Total Organic Matter (g L <sup>-1</sup> )	0.03	1.000
Total Carbon (g L <sup>-1</sup> )	0.03	1.000
Magnesium (g L <sup>-1</sup> )	0.03	1.000

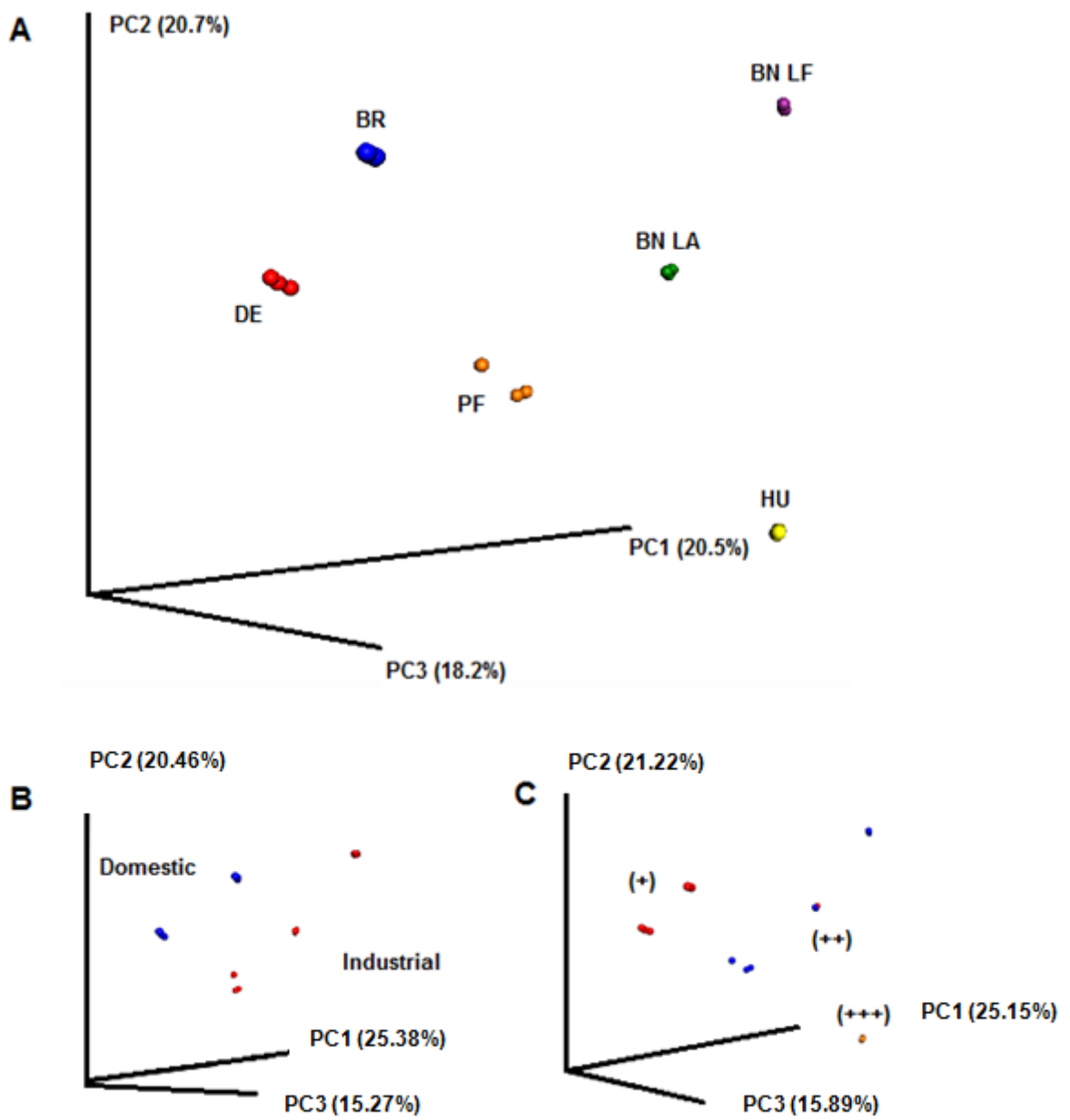
\* Attributes that contribute to alterations in the SRB and SOB communities.

## Figure legends

**Figure 1.** Structure of the total bacterial community evaluated by principal coordinates analysis (PCoA). (A) Sample type ( $R = 0.99$ ,  $p = 0.001$ ); (B) source of the wastewater ( $R = 0.86$ ,  $p = 0.001$ ); (C) oxygen content ( $R = 0.55$ ,  $p = 0.001$ ).

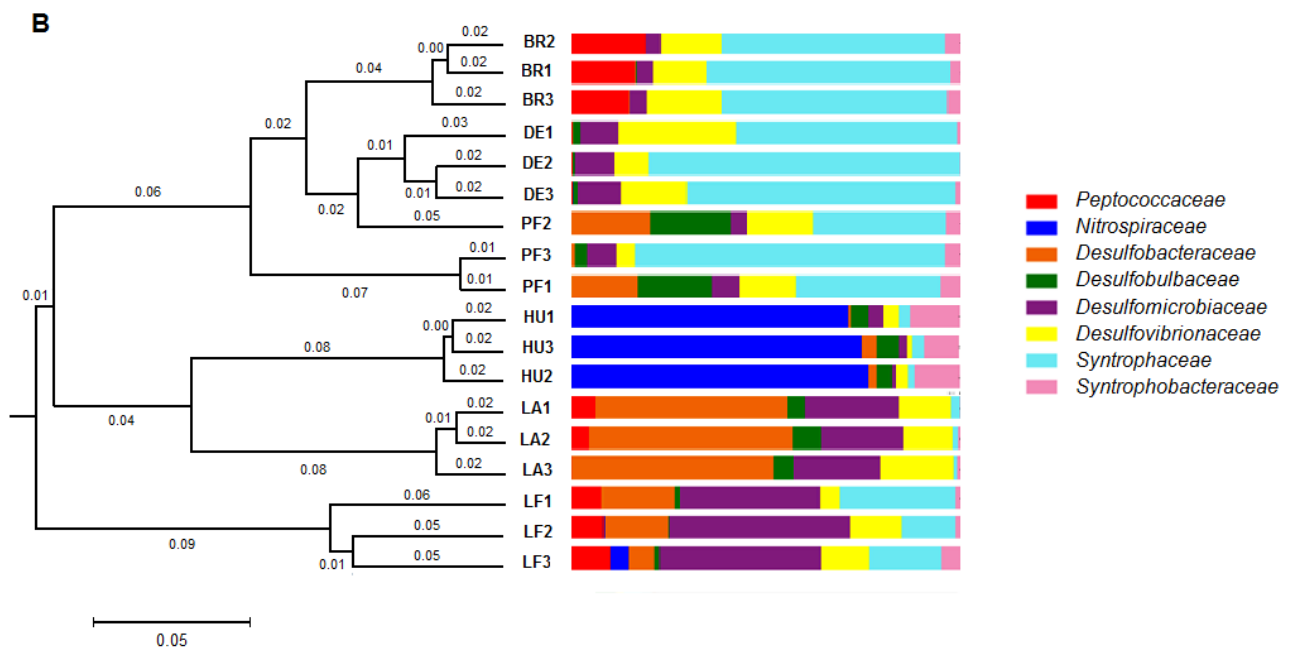
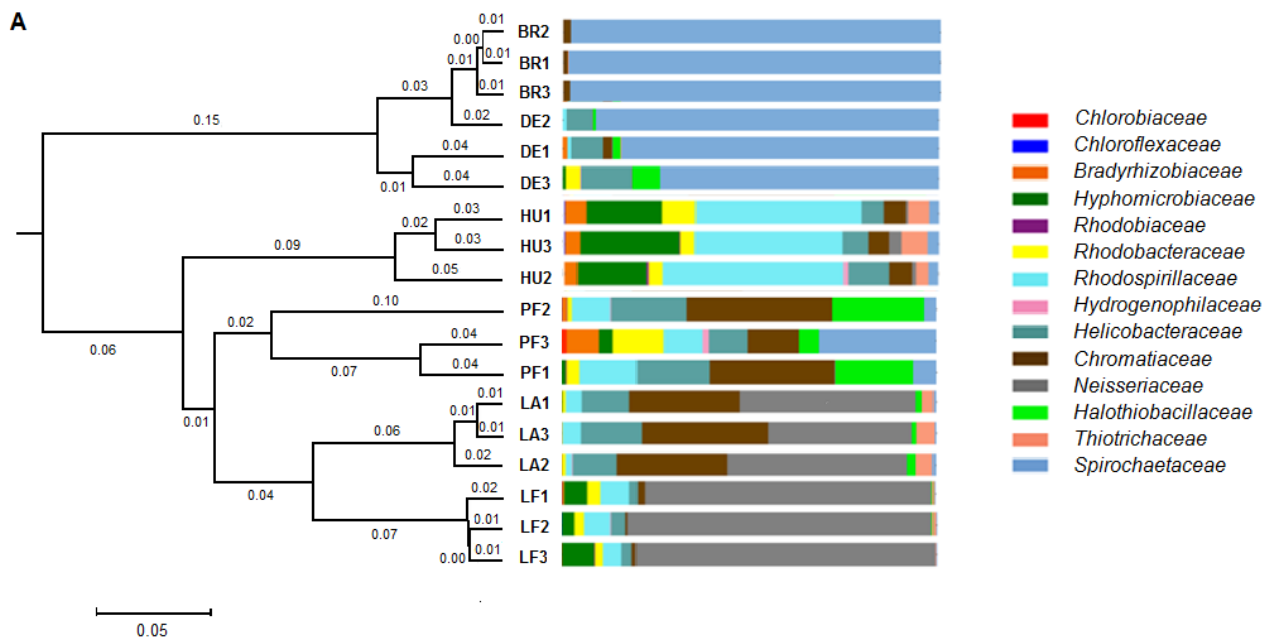
**Figure 2.** Profile of bacterial communities from the taxonomic family category. (A) sulfur-oxidizing bacteria, (B) sulfate-reducing bacteria, and (C) sulfate-reducing bacteria and sulfur-oxidizing bacteria. Demonstration of the clustering patterns between the different sampling points for dendrogram analysis.

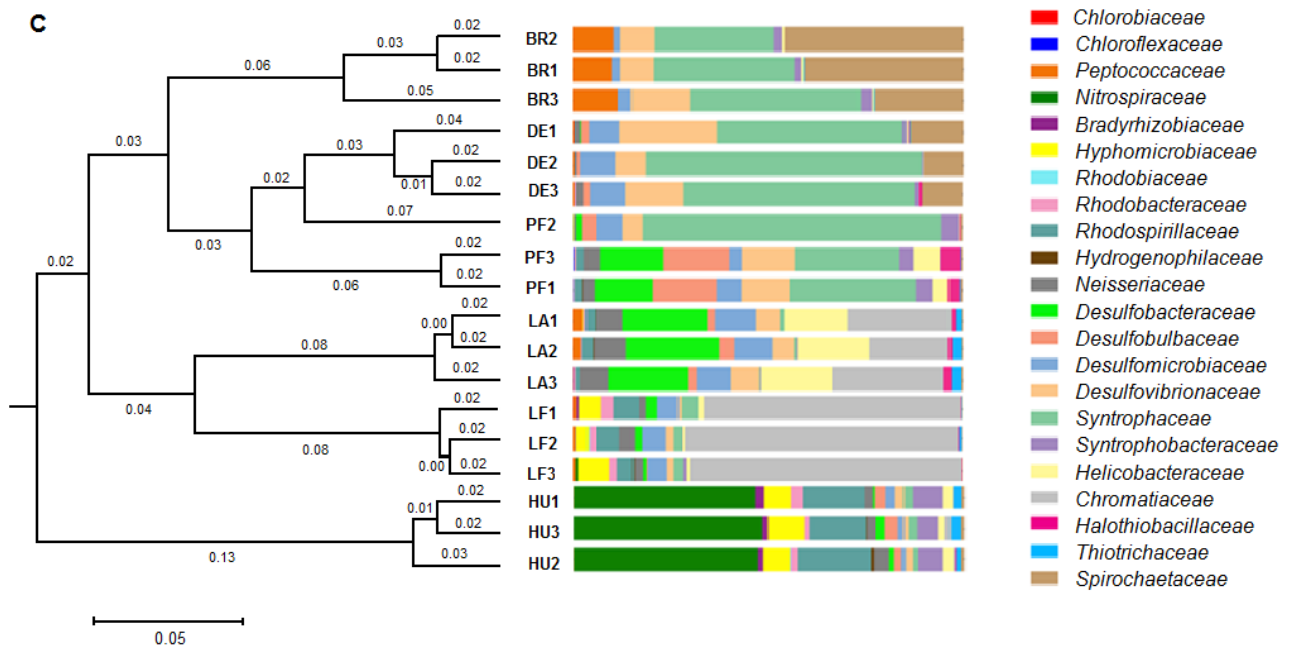
**Figure 3.** Response curve for the presence of sulfur in the samples in relation to different OTUs from SRB and SOB. OTUs 2032, 438 and 7333, correspond to *Syntrophus*, *Syntrophus* and *Desulfomicrobium* genus, respectively.



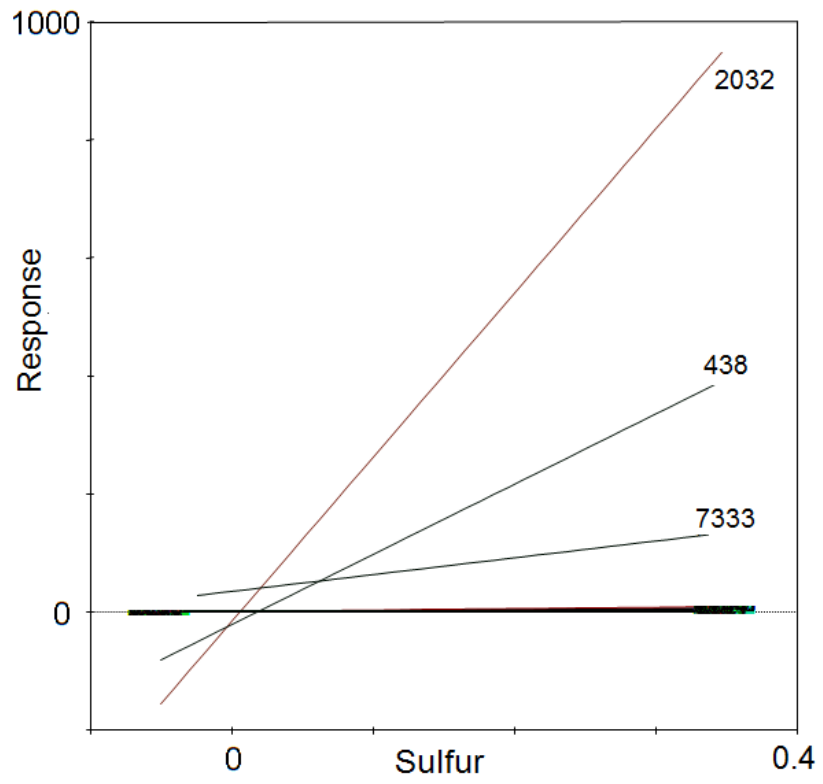
Meyer et al., Fig. 1







Meyer et al., Fig. 2



Meyer et al., Fig. 3

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Estudo 1: Seleção de isolados bacterianos oxidadores de enxofre potencialmente efetivos no controle da emissão de H<sub>2</sub>S

#### 6.1.1 Isolamento e enriquecimento dos isolados bacterianos

A partir do caldo inorgânico enriquecido com tiosulfato (caldo G – Tabela 2) e submetido à pressão seletiva por 21 dias a 35° C sob condições de microaerofilia e de aerobiose, foi possível obter 39 isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre por técnicas dependentes de cultivo e com potencial para a quimioautotrofia. Desse total, 21 isolados foram prospectados de biorreatores anaeróbicos (BR- 5, DE – 10 e PF – 6), 9 obtidos de amostras de lodo ativado (HU) e 7 restantes de amostras de duas lagoas de estabilização (BN). Para esse último ponto de amostragem, as duas amostras foram anteriormente misturadas (BN LA + BN LF) para, então, passar pelos bioensaios de enriquecimento. Por fim, o mesmo procedimento foi realizado para selecionar micro-organismos com potencial para oxidação de enxofre de um produto comercial para controlar odores, obtendo-se mais dois isolados bacterianos (OD1 e OD2). Ainda, utilizou-se uma linhagem bacteriana como controle positivo, *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512, a fim de comparar com os resultados da curva de crescimento e produção de sulfato em relação aos isolados prospectados nas amostras ambientais. Posteriormente, verificou-se que todos os 40 micro-organismos também tinham capacidade de atuarem em heterotrofia, quando o caldo G foi suplementado com glicose, visto que foi observado crescimento celular mais acelerado em solução orgânica em comparação ao caldo G inorgânico. Assim, todos os isolados bacterianos deste estudo apresentaram metabolismo mixotrófico. Observa-se que alguns trabalhos dão enfoque ao isolamento e enriquecimento de isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre e revelam que, na maioria dos seus resultados, tais micro-organismos também apresentam esse metabolismo. Isso resulta em um crescimento celular mais intenso na presença de compostos orgânicos, como glicose ou extrato de levedura (Kantachote & Innuwat, 2004; Kantachote et al., 2007). Tais condições ampliaram a diversidade metabólica,

o que pode favorecer um maior sucesso de sobrevivência sob diferentes fontes de carbono, seja inorgânico seja orgânico.

### **6.1.2 Primeiro processo de seleção dos isolados potencialmente oxidadores de enxofre**

No primeiro processo de seleção para obtenção de bactérias potencialmente oxidadoras de enxofre, foram desenvolvidas curvas de crescimento em duplicata durante 4 dias de incubação sob condições de microaerofilia (frascos sem agitação) a 35° C em caldo G suplementado com tiosulfato de sódio ou sulfito de sódio + 1% de glicose. A contagem de heterotróficos por UFC.mL<sup>-1</sup> foi monitorada diariamente ao longo dos quatro dias de incubação e os valores por UFC.mL<sup>-1</sup> dos 40 isolados podem ser visualizados na Tabela 4.

Anteriormente ao experimento que gerou os resultados da Tabela 4, foi realizado um teste piloto para a curva de crescimento, utilizando caldo inorgânico (dados não apresentados) em que alguns isolados foram monitorados a partir da contagem de colônias em placas de petri. No entanto, dificuldades foram encontradas para realizar tais contagens, dado que o crescimento era muito lento, apresentando valores muito baixos nos primeiros dias de incubação (< 10 colônias em baixas diluições), o que comprometiam os resultados do experimento, além de ter que prolongar o tempo de incubação, gerando obstáculos de logística em laboratório. Como os isolados se multiplicaram mais rapidamente em meio orgânico, escolheu-se a glicose como fonte de carbono para avaliar as taxas de crescimento celular dos diferentes isolados, simulando as mesmas condições e composição de um efluente industrial/doméstico. Em estudos de Kantachote & Innuwat (2004), todos os isolados bacterianos do gênero *Thiobacillus* também apresentaram melhor crescimento em caldo orgânico. Esses resultados podem ser explicados, porque, provavelmente, o metabolismo quimioautotrófico acaba por ser mais complexo por questões enzimáticas, tendo que produzir as moléculas orgânicas a partir de inorgânicas para posteriormente serem catabolizadas pelo micro-organismo, a fim de produzir energia.

Tabela 4: Avaliação das curvas de crescimento de 40 isolados + *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 ao longo de quatro dias de incubação.

	Sulfito de sódio				Tiosulfato de sódio			
	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia
<b>HU1<sup>a</sup></b>	<b>1,53.10<sup>8</sup></b>	<b>8,1. 10<sup>8</sup></b>	<b>7,27.10<sup>8</sup></b>	<b>7,2. 10<sup>8</sup></b>	<b>3,85.10<sup>8</sup></b>	<b>4,2.10<sup>9</sup></b>	<b>2,3.10<sup>9</sup></b>	<b>7,95.10<sup>8</sup></b>
HU2	1.10 <sup>3</sup>	1,97.10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>3</sup>	6,85.10 <sup>6</sup>	7,15.10 <sup>7</sup>	2,2.10 <sup>7</sup>
HU3	1,5. 10 <sup>4</sup>	14,7.10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>5</sup>	8,12.10 <sup>7</sup>	1,6.10 <sup>7</sup>	1.10 <sup>8</sup>	4,05.10 <sup>8</sup>	4,15.10 <sup>7</sup>
HU4	1,52.10 <sup>6</sup>	2,32.10 <sup>7</sup>	2,5.10 <sup>7</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	7,7.10 <sup>7</sup>	5,3.10 <sup>8</sup>	7,15.10 <sup>7</sup>	6.10 <sup>7</sup>
<b>HU5<sup>a</sup></b>	<b>1,77.10<sup>8</sup></b>	<b>5,3.10<sup>8</sup></b>	<b>6,33.10<sup>8</sup></b>	<b>9,15.10<sup>8</sup></b>	<b>7,21.10<sup>8</sup></b>	<b>2.10<sup>9</sup></b>	<b>2,81.10<sup>9</sup></b>	<b>2,75.10<sup>9</sup></b>
HU6	4,22.10 <sup>5</sup>	6,02.10 <sup>6</sup>	1,85.10 <sup>7</sup>	1,64.10 <sup>7</sup>	6,2.10 <sup>6</sup>	6,2.10 <sup>6</sup>	5,9.10 <sup>8</sup>	8,25.10 <sup>8</sup>
HU7	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	2,5.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>	1.10 <sup>6</sup>	3,85.10 <sup>6</sup>	8,8.10 <sup>7</sup>	6,6.10 <sup>6</sup>
HU8	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	3,1.10 <sup>5</sup>	7,15.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1,4.10 <sup>5</sup>
HU9	2,5.10 <sup>5</sup>	2,97. 10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>5</sup>	2,1.10 <sup>5</sup>	1,47.10 <sup>7</sup>	2,35.10 <sup>7</sup>	2,25.10 <sup>7</sup>	3,25.10 <sup>7</sup>
<b>DE1<sup>a</sup></b>	<b>3,75. 10<sup>8</sup></b>	<b>1,57. 10<sup>8</sup></b>	<b>3,46.10<sup>8</sup></b>	<b>4,05.10<sup>8</sup></b>	<b>2,8.10<sup>8</sup></b>	<b>3,45.10<sup>8</sup></b>	<b>7,35.10<sup>8</sup></b>	<b>5,65.10<sup>8</sup></b>
DE2	1,63.10 <sup>6</sup>	7,8.10 <sup>7</sup>	2,13.10 <sup>8</sup>	1,41.10 <sup>8</sup>	3,66.10 <sup>7</sup>	1,6.10 <sup>7</sup>	1,41.10 <sup>7</sup>	1,85.10 <sup>7</sup>
DE3	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>
DE5	1,2.10 <sup>6</sup>	1,68.10 <sup>6</sup>	9,55.10 <sup>6</sup>	2,5.10 <sup>7</sup>	2,64.10 <sup>6</sup>	2,64.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>4</sup>
DE7	2,26.10 <sup>7</sup>	1,91.10 <sup>7</sup>	2,44.10 <sup>7</sup>	2,81.10 <sup>7</sup>	1,12.10 <sup>6</sup>	2,08.10 <sup>8</sup>	6,6,.10 <sup>7</sup>	3.10 <sup>7</sup>
DE8	-	-	-	-	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>
<b>DE9<sup>a</sup></b>	<b>3,73.10<sup>5</sup></b>	<b>7,3.10<sup>6</sup></b>	<b>4,26.10<sup>7</sup></b>	<b>3,93.10<sup>8</sup></b>	<b>4,62.10<sup>6</sup></b>	<b>3,58.10<sup>8</sup></b>	<b>3,13.10<sup>8</sup></b>	<b>2,05.10<sup>8</sup></b>
DE10	2,48.10 <sup>6</sup>	2,27.10 <sup>7</sup>	5,67.10 <sup>7</sup>	3,32.10 <sup>7</sup>	1,11.10 <sup>8</sup>	6,52.10 <sup>8</sup>	4,7.10 <sup>8</sup>	4,97.10 <sup>8</sup>
DE11	-	--	-	-	1.10 <sup>3</sup>	5,5.10 <sup>5</sup>	2,92.10 <sup>6</sup>	3,1.10 <sup>6</sup>
DE12	4,65.10 <sup>5</sup>	1,25.10 <sup>6</sup>	6,27.10 <sup>6</sup>	8,8.10 <sup>6</sup>	1,8.10 <sup>7</sup>	1,8.10 <sup>7</sup>	2,9.10 <sup>8</sup>	3,85.10 <sup>8</sup>
BR1	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1,31.10 <sup>7</sup>
BR2	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	6,3.10 <sup>6</sup>	6,3.10 <sup>6</sup>	4.10 <sup>6</sup>	4.10 <sup>6</sup>
BR3	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1,95.10 <sup>6</sup>	2,45.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>6</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>
<b>BR4<sup>a</sup></b>	<b>4,3.10<sup>4</sup></b>	<b>4,31.10<sup>7</sup></b>	<b>4,77.10<sup>7</sup></b>	<b>1,19.10<sup>8</sup></b>	<b>1.10<sup>6</sup></b>	<b>1.10<sup>6</sup></b>	<b>1,4.10<sup>8</sup></b>	<b>6,2.10<sup>8</sup></b>
<b>BR5<sup>a</sup></b>	<b>5,5.10<sup>6</sup></b>	<b>2,28. 10<sup>8</sup></b>	<b>7,4.10<sup>8</sup></b>	<b>1.10<sup>9</sup></b>	<b>3,5.10<sup>8</sup></b>	<b>1,63.10<sup>9</sup></b>	<b>2,88.10<sup>9</sup></b>	<b>1,32.10<sup>9</sup></b>
<b>BN1<sup>a</sup></b>	<b>4,45.10<sup>7</sup></b>	<b>3,9.10<sup>8</sup></b>	<b>3,47.10<sup>8</sup></b>	<b>4,8.10<sup>8</sup></b>	<b>6,2.10<sup>8</sup></b>	<b>3,25.10<sup>9</sup></b>	<b>1,9.10<sup>8</sup></b>	<b>1,7.10<sup>8</sup></b>
<b>BN2<sup>a</sup></b>	<b>3.10<sup>8</sup></b>	<b>4.10<sup>8</sup></b>	<b>2,82.10<sup>9</sup></b>	<b>5,05.10<sup>9</sup></b>	<b>2,59.10<sup>9</sup></b>	<b>2,75.10<sup>9</sup></b>	<b>2,5.10<sup>9</sup></b>	<b>1,45.10<sup>9</sup></b>

<b>BN3<sup>a</sup></b>	<b>1,92.10<sup>7</sup></b>	<b>1,39.10<sup>8</sup></b>	<b>4,34.10<sup>8</sup></b>	<b>5,1. 10<sup>8</sup></b>	<b>4,85.10<sup>8</sup></b>	<b>2,2.10<sup>9</sup></b>	<b>2,4.10<sup>8</sup></b>	<b>1,4.10<sup>8</sup></b>
<b>BN4<sup>a</sup></b>	<b>1,14.10<sup>7</sup></b>	<b>8,45.10<sup>7</sup></b>	<b>1,95.10<sup>8</sup></b>	<b>2,94.10<sup>8</sup></b>	<b>2,3.10<sup>8</sup></b>	<b>3,3.10<sup>9</sup></b>	<b>1,45.10<sup>9</sup></b>	<b>2,05.10<sup>9</sup></b>
<b>BN5<sup>a</sup></b>	<b>3,45.10<sup>6</sup></b>	<b>5,3.10<sup>7</sup></b>	<b>1,45.10<sup>8</sup></b>	<b>7.10<sup>8</sup></b>	<b>8,58.10<sup>8</sup></b>	<b>1,85.10<sup>8</sup></b>	<b>1,35.10<sup>8</sup></b>	<b>6,1.10<sup>8</sup></b>
<b>BN6<sup>a</sup></b>	<b>1,29.10<sup>8</sup></b>	<b>7,45.10<sup>8</sup></b>	<b>2,16.10<sup>8</sup></b>	<b>1.10<sup>8</sup></b>	<b>2,95.10<sup>8</sup></b>	<b>1,3.10<sup>9</sup></b>	<b>1,95.10<sup>9</sup></b>	<b>2,7.10<sup>9</sup></b>
BN7	1,39.10 <sup>6</sup>	1,87.10 <sup>6</sup>	2,8.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>
PF1	1,2.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>6</sup>	3,1.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>4</sup>	9,52.10 <sup>6</sup>	2,9.10 <sup>7</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>4</sup>
PF2	2,7.10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>4</sup>	1,35.10 <sup>6</sup>	1,5.10 <sup>6</sup>	4,72.10 <sup>7</sup>	1,68.10 <sup>8</sup>	2,37.10 <sup>8</sup>	2,42.10 <sup>8</sup>
PF3	-	-	-	-	-	-	-	-
PF4	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>
PF5	-	-	-	-	-	-	-	-
PF6	-	-	-	-	-	-	-	-
OD1	10 <sup>3</sup>	2,47.10 <sup>6</sup>	6,87.10 <sup>6</sup>	4,17.10 <sup>6</sup>	7,07.10 <sup>7</sup>	7,5.10 <sup>8</sup>	2,94.10 <sup>7</sup>	2,35.10 <sup>7</sup>
OD2	-	-	-	-	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>	1.10 <sup>3</sup>
<b>Para<sup>b</sup></b>	<b>3,3.10<sup>6</sup></b>	<b>1,09.10<sup>7</sup></b>	<b>1,72.10<sup>8</sup></b>	<b>1,2.10<sup>8</sup></b>	<b>5,57.10<sup>6</sup></b>	<b>1,19.10<sup>8</sup></b>	<b>2,55.10<sup>8</sup></b>	<b>7,7.10<sup>8</sup></b>

<sup>a</sup> isolados bacterianos selecionados para detecção de sulfato (em negrito)

<sup>b</sup> *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512

\* média das UFC.mL<sup>-1</sup> entre as duplicatas.

O critério de seleção dos isolados bacterianos a partir da curva de crescimento foi estimado tanto pelos maiores crescimentos celulares em quatro dias de incubação (> 10<sup>8</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>) quanto pelas menores diferenças de crescimento celular do mesmo isolado para os dois caldos G avaliados (com tiosulfato e sulfato de sódio). Esse último critério foi estabelecido, uma vez que o isolado que foi selecionado para controlar odores oriundos de intermediários de enxofre em Estações de Tratamento de Efluentes deveria se adaptar a diferentes fontes de enxofre disponíveis no ambiente. A partir da análise da Figura 4, 50% dos isolados (20/40) não apresentaram resultados de crescimento significativo para ambos os caldos G contendo glicose, ou seja, expressaram valores inferiores a 10<sup>8</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>. Por outro lado, 7 isolados (HU4, HU6, DE2, DE10, DE12, BR3 e PF2) obtiveram crescimento significativo (> 10<sup>8</sup> UFC. mL<sup>-1</sup>) para apenas um dos caldos G. No entanto, somente 12 isolados (HU1, HU5, DE1, DE9, BR4, BR5, BN1, BN2, BN3, BN4, BN5, BN6) e *Paracoccus pantotrophus* (controle positivo) apresentaram

crescimento significativo para ambos os caldos e foram selecionados para as próximas etapas de avaliação do potencial de oxidação do enxofre. Além disso, ao avaliar os isolados que expressaram crescimento significativo em pelo menos um caldo G, 65% deles apresentaram maior crescimento em caldo G contendo tiosulfato + 1% de glicose. Isso pode ser explicado, dado que os isolados foram primeiramente enriquecidos com caldo inorgânico G com apenas tiosulfato de sódio como fonte de enxofre. A pressão seletiva obtida sobre esses isolados bacterianos pode ter contribuído não somente para a maior frequência de crescimento no meio suplementado com tiosulfato de sódio, mas também na obtenção dos maiores valores de UFC. mL<sup>-1</sup> como observado, principalmente, em HU5, BN4 e BN6 (Figura 4). Foi observado também que cinco isolados bacterianos (HU1, HU5, DE1, BN2 e BN6) apresentaram crescimento celular de, pelo menos, 1.10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> para os dois caldos já no primeiro dia de incubação, e 7 isolados (HU1, HU5, BR5, BN1, BN2, BN4, BN6) atingiram crescimentos na escala de 10<sup>9</sup> em um dos caldos G avaliados.

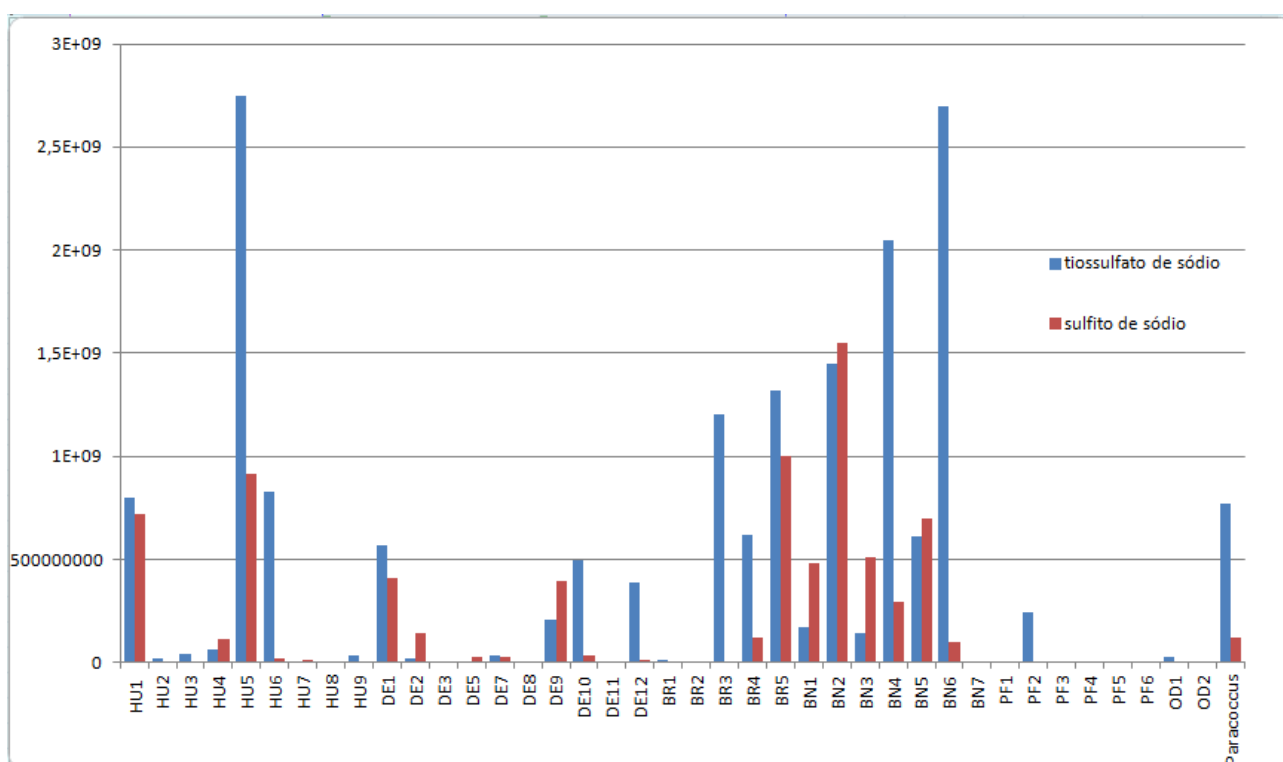


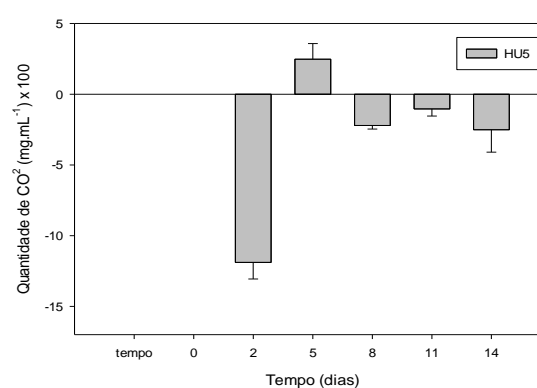
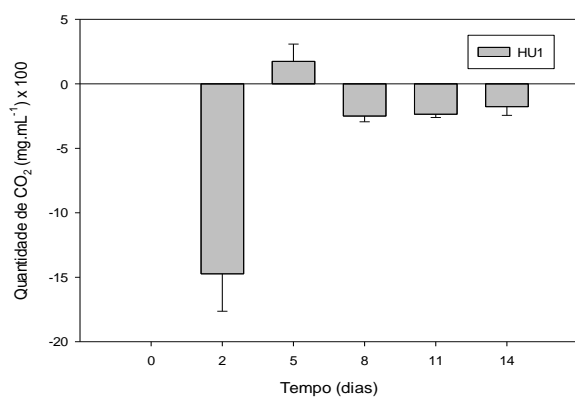


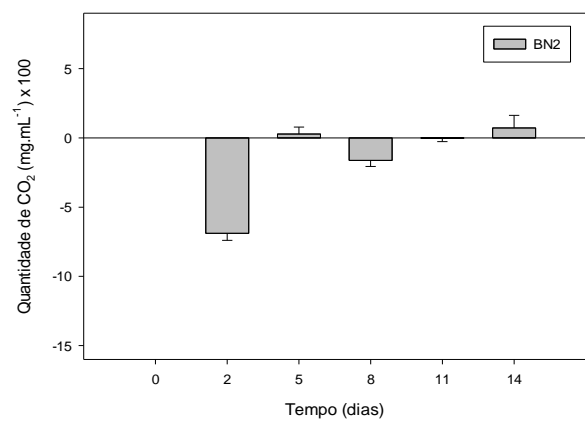
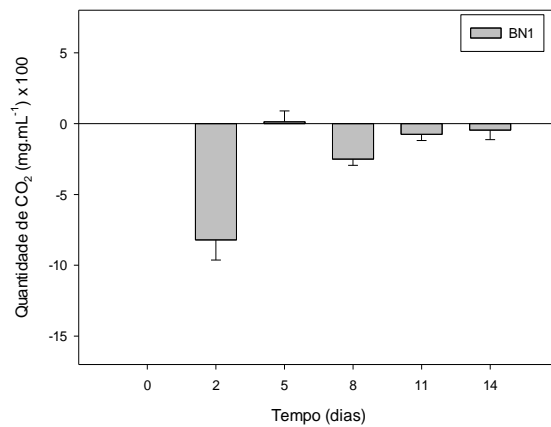
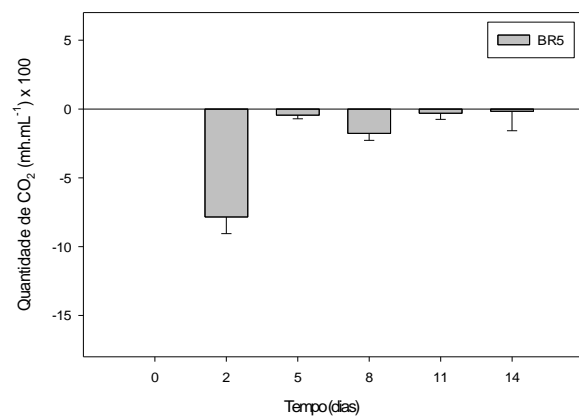
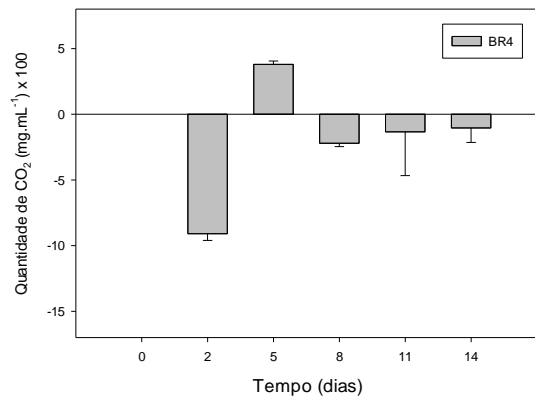
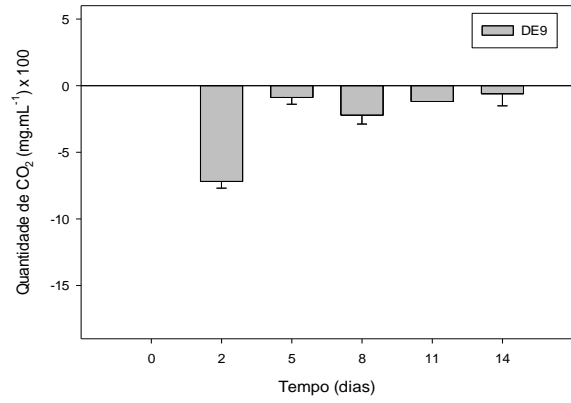
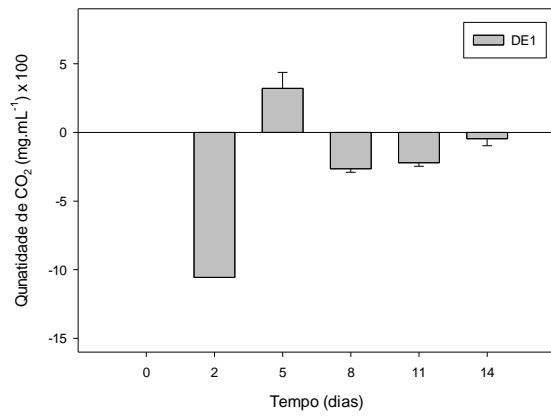
Figura 4: Curva de crescimento de 40 isolados bacterianos oxidadores de sulfato após quatro dias de incubação em caldo G (tiosulfato de sódio ou sulfito de sódio) + 1% de glicose. Os valores de crescimento celular estão em UFC.mL<sup>-1</sup>.

### **6.1.3 Segundo processo de seleção dos isolados potencialmente oxidadores de enxofre**

Os 12 isolados bacterianos + *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512, selecionados pelos melhores resultados da curva de crescimento, foram submetidos à segunda etapa de seleção, a fim de aumentar as possibilidades de se obter resultados expressivos para a produção de sulfato. Nessa etapa, foi monitorado o crescimento microbiano por meio da liberação de CO<sub>2</sub> pela técnica de respirometria ao longo de 14 dias de incubação em caldo inorgânico contendo tiosulfato de sódio e pela produção de sulfato ao final desse período. Antes desse procedimento, foi realizado um experimento com a linhagem referência, *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512, submetendo a cepa a um caldo inorgânico (caldo G), suplementado com três diferentes substratos (tiosulfato, sulfeto ou tiosulfito de sódio) para verificar a produção de sulfato (Meyer et al., 2015). Para essa avaliação, foram utilizados três diferentes métodos de detecção de sulfato (espectrofotometria, espectrometria de absorção atômica e cromatografia iônica). Os resultados, expressos no artigo 1 desta tese, intitulado “*Sulphate production by Paracoccus pantotrophus ATCC 35512 from different sulfur substrates: sodium thiosulphate, sulphite and sulphide*”, foram importantes para delinear os experimentos da etapa de seleção seguinte, uma vez que apenas o caldo G suplementado com tiosulfato de sódio apresentou diferenças significativas entre o controle negativo (ausência de micro-organismos) e a linhagem avaliada. Além disso, observou-se que, embora as três técnicas de detecção de sulfato tenham apresentado padrões estatísticos semelhantes, a detecção de sulfato por cromatografia iônica mostrou-se mais sensível, apresentando valores mais elevados em relação às outras duas técnicas abordadas. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos do artigo 1, foram selecionados apenas o caldo G inorgânico suplementado com tiosulfato de sódio e a técnica de cromatografia iônica para as próximas etapas de avaliação em que os 13 isolados bacterianos foram submetidos.

Para a segunda etapa de seleção, os resultados da liberação de  $\text{CO}_2$  da curva de crescimento podem ser visualizados na Figura 5. A respirometria é um método clássico para avaliar, de forma indireta, a taxa metabólica a partir da liberação de  $\text{CO}_2$  pela atividade respiratória (Margesin et al., 2000). No entanto, os isolados bacterianos que foram submetidos a essa técnica cresceram às expensas de um caldo inorgânico, contendo bicarbonato de sódio como única fonte de carbono. Nessas condições, eles atuaram de forma quimioautotrófica. Como a metodologia respirométrica tem como base o cálculo a partir da captura do  $\text{CO}_2$  desprendido pela respiração, é bem provável que durante o período de incubação o  $\text{CO}_2$  tenha sido tanto liberado quanto consumido. Essa é uma ótima técnica para avaliar o crescimento de micro-organismos heterotróficos, tornando-se difícil a avaliação da atividade microbiana de natureza metabólica diferente, como é o caso dos quimioautotróficos. Muitos desses resultados apresentaram valores negativos, ou seja, em determinados pontos da curva, houve mais consumo do que liberação de  $\text{CO}_2$  em relação ao controle negativo (sem micro-organismos). Embora esses resultados negativos de  $\text{CO}_2$  não sejam habituais em estudos utilizando essa ferramenta para medir a atividade microbiana, foi possível medir a taxa metabólica dos isolados por meio de um somatório da variação de valores positivos (liberação de  $\text{CO}_2 >$  captação de  $\text{CO}_2$ ) e negativos (liberação de  $\text{CO}_2 <$  captação de  $\text{CO}_2$ ) durante os vários pontos de monitoramento ao longo do período de 14 dias de incubação.





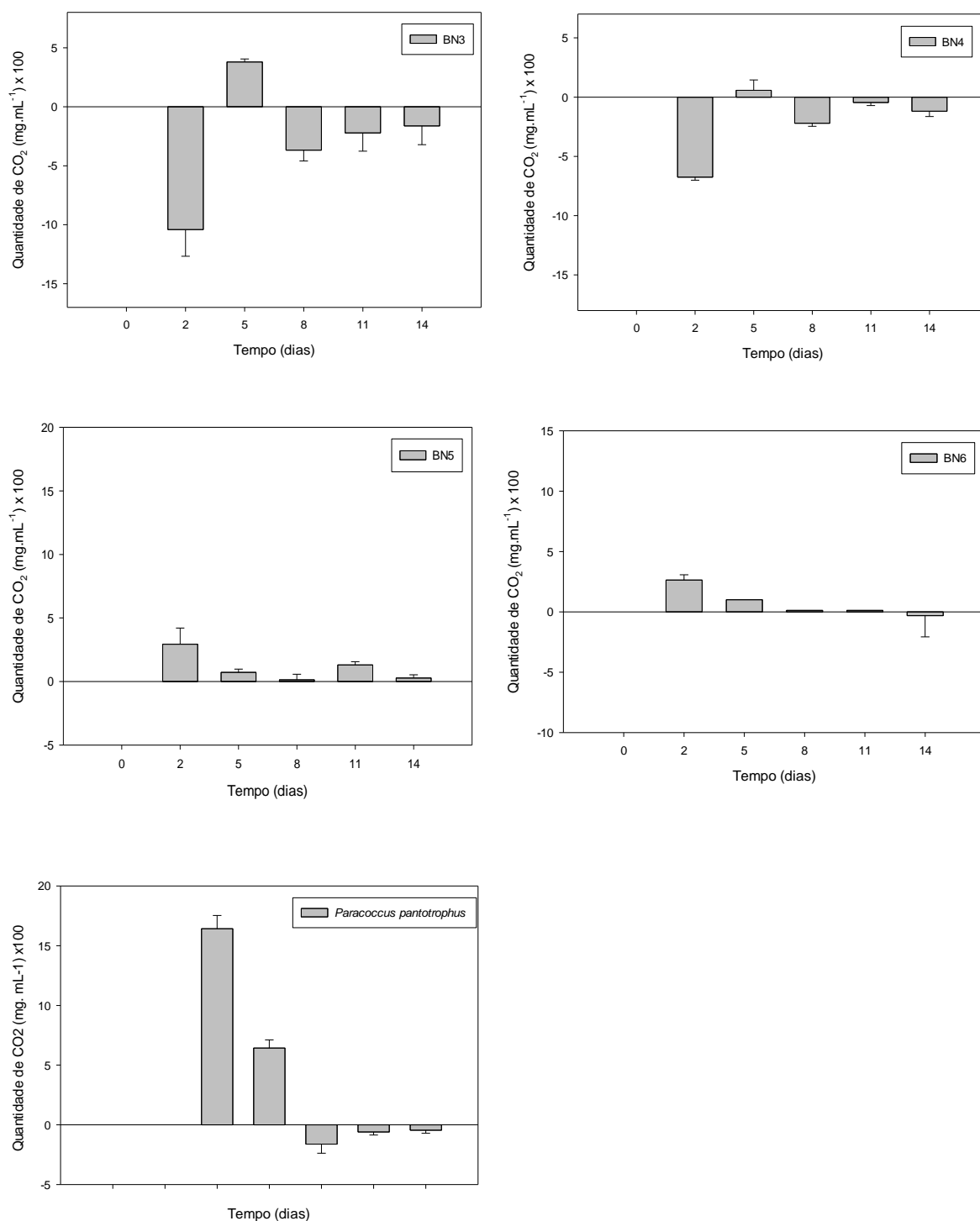


Figura 5: Avaliação da atividade metabólica a partir da liberação e consumo de CO<sub>2</sub> para 12 isolados bactérias potencialmente oxidadores de enxofre (HU1, HU5, DE1, DE9, BR4, BR5, BN1, BN2, BN3, BN4, BN5, BN6 + controle positivo (*Paracoccus pantotrophus*). Cada isolado bacteriano foi submetido à curva de crescimento em caldo inorgânico suplementado com tiosulfato de sódio, à temperatura de 35°C em condições de microaerofilia por um período de 14 dias.

Na figura 6, pode-se observar o somatório da atividade metabólica de liberação e consumo de CO<sub>2</sub> ao longo dos 14 dias de incubação em caldo G inorgânico. Dos 13 isolados bacterianos avaliados, observa-se que seis deles (HU1, HU5, DE1, BR4, BN3 + o *Paracoccus pantotrophus*, como controle positivo) apresentaram maiores resultados para esse somatório ao longo do tempo.

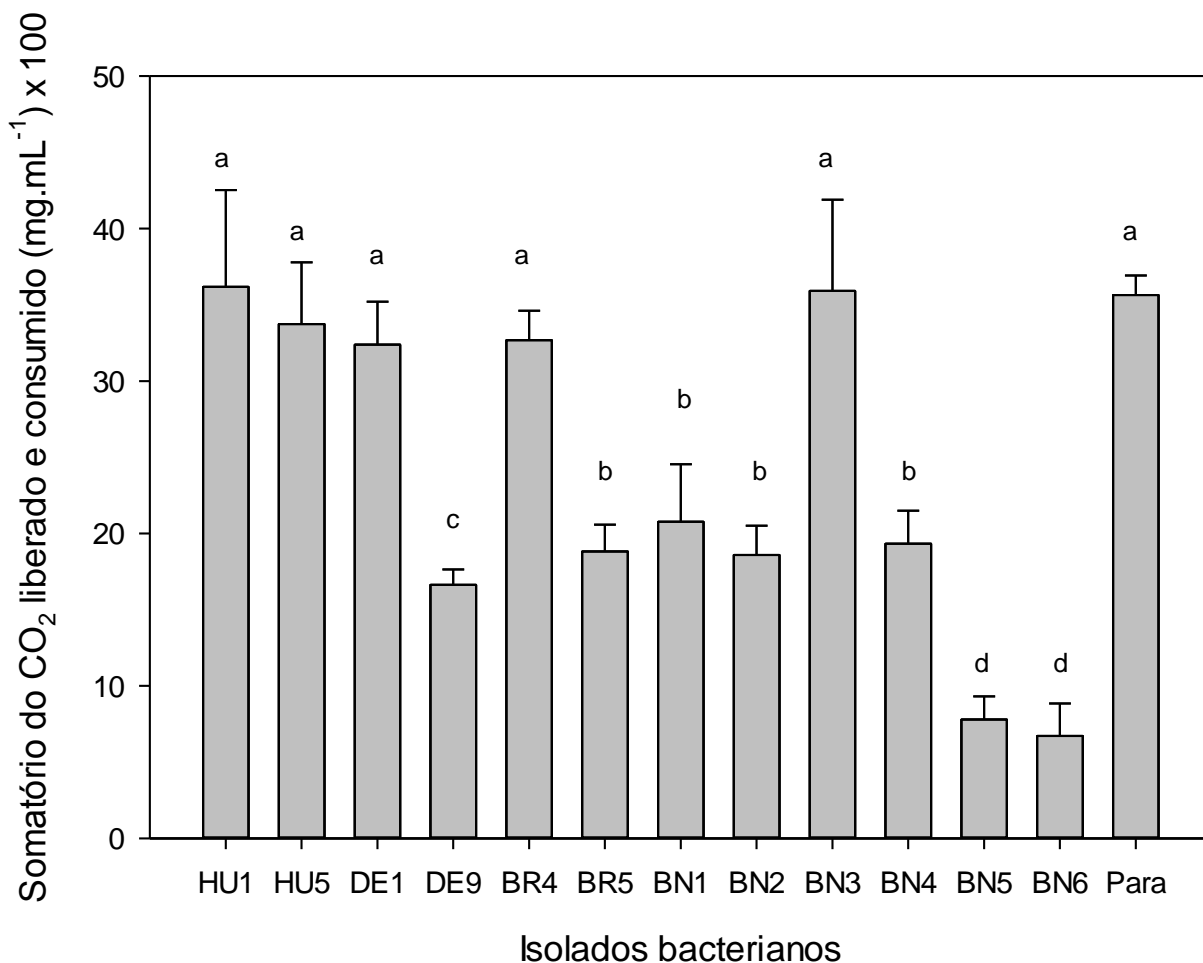


Figura 6: Somatório do CO<sub>2</sub> liberado e consumido de 13 isolados bacterianos, incluindo o *Paracoccus pantotrophus* como controle positivo, <sup>a,b,c,d</sup> Teste de Tukey (p < 0,05).

Ao realizar a determinação de sulfato a partir da cromatografia iônica após 14 dias de incubação em que 13 isolados bacterianos estiveram às expensas de um caldo inorgânico suplementado com tiosulfato de sódio, não foi observada

produção biológica de sulfato, a não ser pelo próprio controle positivo (*Paracoccus pantotrophus*) (Figura 7). Os resultados negativos obtidos para produção de sulfato promoveram uma mudança radical em relação aos objetivos e ao delineamento estrutural do estudo: como definido inicialmente no projeto de pesquisa, a ideia principal seria prospectar e selecionar isolados bacterianos que fossem potencialmente competentes na conversão de análogos de H<sub>2</sub>S em sulfato. Assim, os isolados com os melhores resultados alcançados nas curvas de crescimento e na quantificação de sulfato biológico seriam eleitos para compor um consórcio bacteriano e, finalmente, testados em efluentes com problemas de emissões de H<sub>2</sub>S em escala laboratorial. Dessa forma, toda a cadeia de continuidade dos experimentos a partir desses resultados foi desfeita e redirecionada para estudos de composição e estrutura das comunidades bacterianas do ciclo do enxofre, como foi detalhado no artigo 2 desta tese.

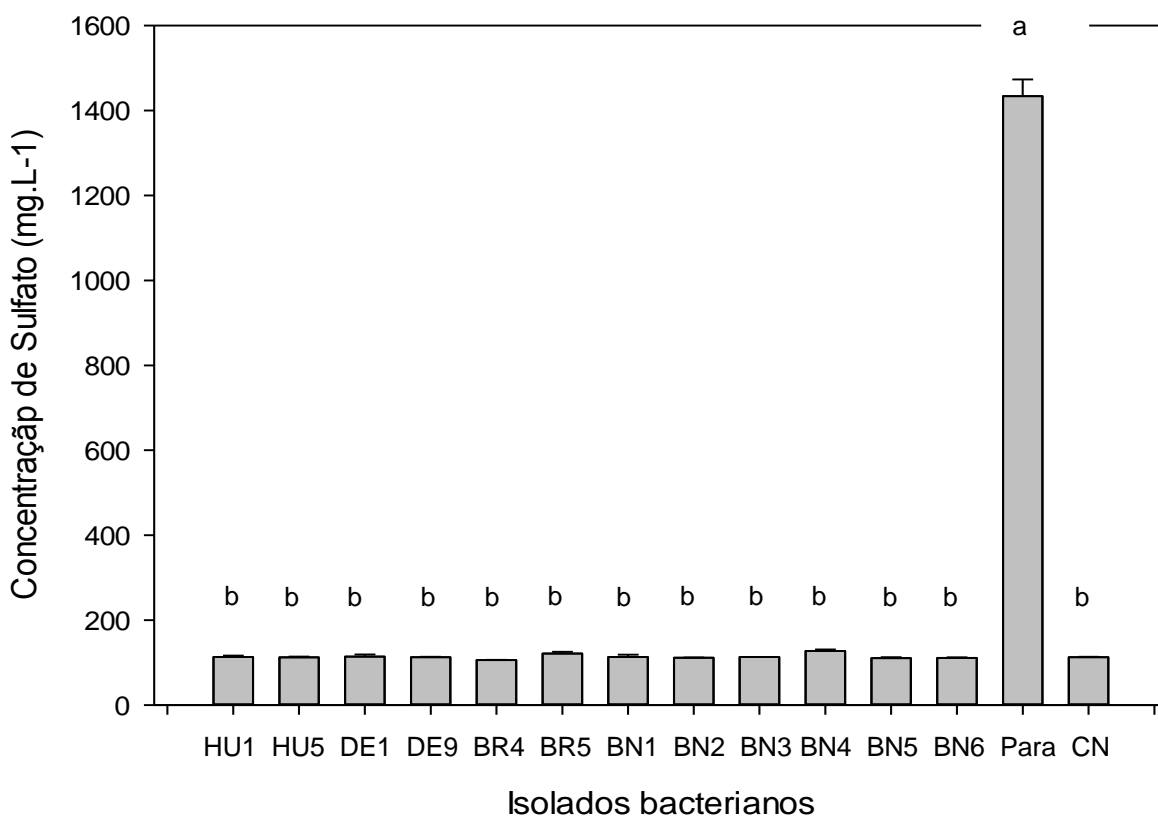


Figura 7: Determinação de sulfato de 13 isolados bacterianos, incluindo o controle positivo (*Paracoccus pantotrophus*) + Controle Negativo (CN) por cromatografia

iônica em caldo G inorgânico suplementando com tiosulfato de sódio após 14 dias de incubação, <sup>a, b</sup> Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

No presente estudo, dos 13 isolados bacterianos que foram selecionados a partir dos melhores resultados, 11 foram comparados com as sequências obtidas pelo NCBI. Dos quatro diferentes tipos de ETEs (HU, DE, BR e BN), foi observada a presença do gênero *Pseudomonas* em três delas. Segundo o dendrograma que compara as sequências dos isolados bacterianos com as sequências do NCBI (Figura 8), pode-se verificar que a grande maioria se assemelhou com o gênero *Pseudomonas* (HU1, HU5, DE1, BN1, BN2, BN3, BN4, BN5, BN6) e apenas um (BR5) com o gênero *Bacillus*, sendo utilizado o *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 como grupo externo. Os isolados (DE9 e BR4) não apresentaram bons resultados no sequenciamento, não sendo possível a inserção de tais sequências no dendrograma.

Estudos prévios com isolados bacterianos potencialmente oxidadores de enxofre obtidos de diferentes compartimentos ambientais indicam uma diversidade nos processos fisiológicos (autotróficos e heterotróficos) (Ruby et al., 1981; Stubner et al., 1998). *Pseudomonas* foi o gênero predominantemente identificado dentre os isolados selecionados, merecendo destaque em relação às amostras de lagoas de estabilização (BN). Resultados semelhantes foram obtidos quando houve processos de enriquecimento e isolamento de bactérias oxidadoras de enxofre a partir de amostras de uma ETE de curtume (Aguilar et al., 2008) e de um biorreator (Luo et al., 2013), utilizando um meio inorgânico com composição semelhante, contendo tiosulfato. Além disso, em outro estudo com biorreatores anaeróbicos, a partir de técnicas independentes de cultivo e utilizando o pirosequenciamento 454, foi possível detectar o gênero *Pseudomonas* associado a outros gêneros potencialmente oxidadores de enxofre, relacionando a sua presença com a diminuição da concentração de sulfeto no sistema (Valdés et al., 2016), assim como em um experimento *in vitro* (Xu et al., 2016). Além disso, Sorokin et al. (1999) avaliou a capacidade dos isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* de oxidar tiosulfato sob condições de desnitrificação. Acredita-se, portanto, que os isolados obtidos no presente estudo, ao passo que metabolizaram tiosulfato, convertendo-o em sulfato, realizaram, de forma concomitante, a transformação de nitrato para N<sub>2</sub>.

Isso provavelmente responde por que foi obtida uma abundância de isolados com alta identidade para o gênero *Pseudomonas* em amostras de lagoas de estabilização, visto que esses sistemas tendem a apresentar baixa taxa de oxigênio dissolvido, sendo um ambiente em potencial para a realização de processos que envolvam a desnitrificação. Além disso, para o gênero *Bacillus* também é atribuído o potencial para oxidar compostos contendo enxofre (Vidyalakshmi et al., 2009), embora não seja frequente encontrar esse gênero em tais estudos.



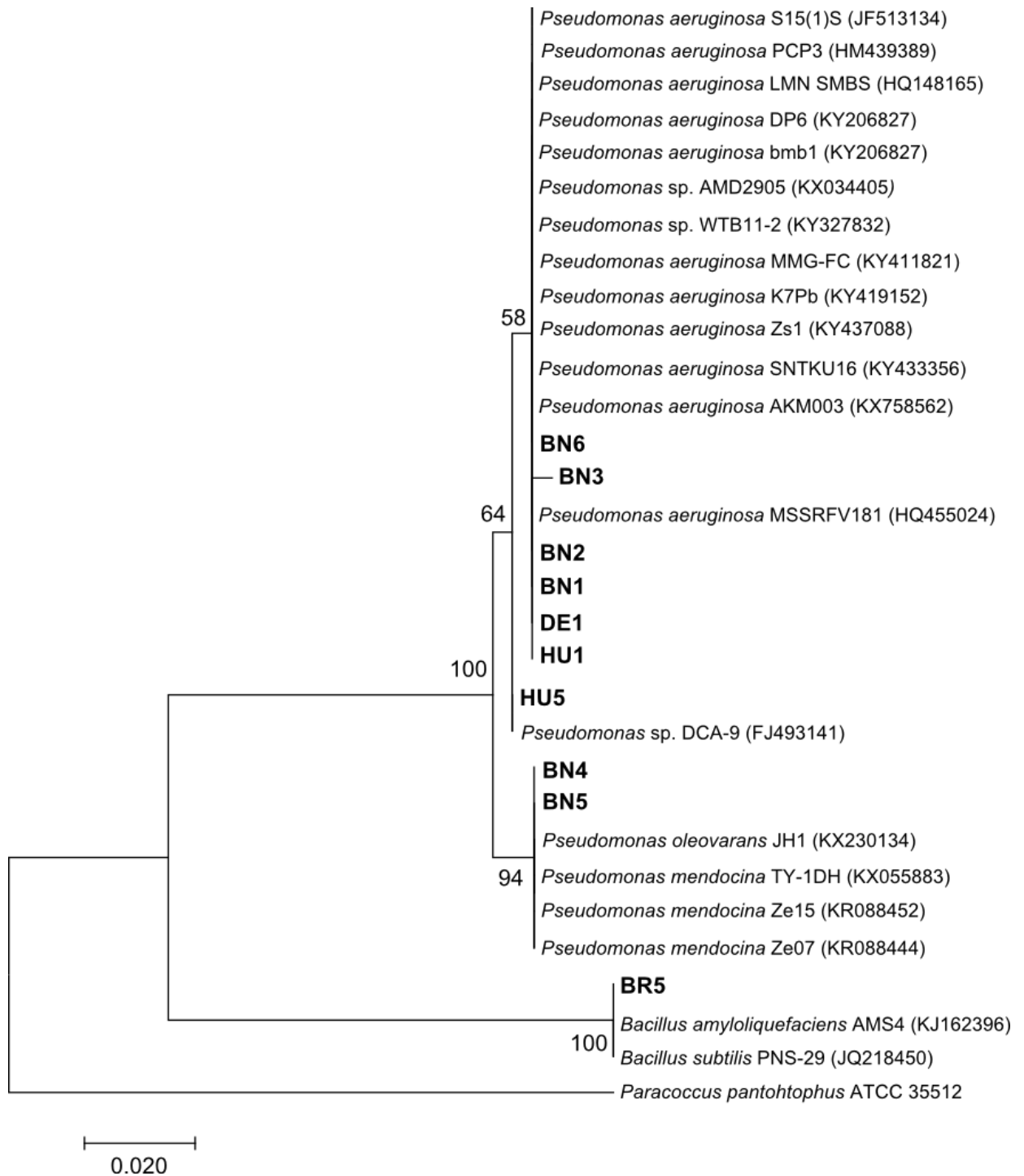


Figura 8: Dendrograma comparando as sequências do gene *16S do RNAr* de 11 isolados bacterianos que apresentaram os melhores resultados para as curvas de crescimento com as sequências extraídas do banco de dados NCBI. Os *bootstraps* acima de 50% foram mostrados nos nós.

Por outro lado, não houve produção de sulfato biológico para nenhum dos isolados selecionados, com exceção ao controle positivo (*P. pantotrophus*) (Figura

6), havendo apenas a produção de sulfato a partir de processos químicos de conversão. Esses resultados negativos para sulfato foram intrigantes, uma vez que os isolados foram incubados unicamente às expensas de tiosulfato em um caldo inorgânico contendo outros macro e micronutrientes minerais (Anexo 1). Assim, era de se esperar que o tiosulfato fosse convertido em sulfato. Por uma outra perspectiva, talvez isso de fato tenha ocorrido. Entretanto, o crescimento bacteriano ao longo dos 14 dias de incubação provavelmente não tenha sido suficiente para gerar quantidades em uma diferente escala de grandeza quando comparado aos valores de sulfato produzido por processos abióticos (controle negativo). Além disso, se esses isolados fossem testados em um caldo de mesma composição, mas suplementado com 1% de glicose, talvez o crescimento celular sendo maior, os valores obtidos para quantidade de sulfato também o seriam.

## **6.2 Estudo 2: caracterização das comunidades bacterianas oxidadoras de enxofre (BOE) e bactérias redutoras de sulfato (BRS) em ETEs, utilizando os genes *aprAB*, *dsrAB* e *soxB* como marcadores funcionais**

Durante o estágio do doutorado sanduíche no Departamento de Microbiologia do *Bremen Institute for Materials Testing*, Alemanha, foram realizadas várias tentativas para amplificação dos genes marcadores funcionais, a fim de prospectar as principais comunidades bacterianas do ciclo do enxofre em ETEs. Para o gene *aprAB*, obteve 100% de amplificação para amostras estudadas; para o gene *dsrAB*, 84%, sendo que BN LF foi a única amostra que não sofreu amplificação. Um dos prováveis motivos de se obter esse último resultado foi que as amostras BN (lagoa de estabilização) se encontravam em uma concentração de DNA muito pequena, devido ao alto nível de diluição do efluente. Por outro lado, para as amostras BN LA, encontraram-se resultados para amplificação tanto para *aprAB* quanto para *dsrAB*. Já para o gene *soxB*, que é um importante marcador para o grupo das bactérias oxidadoras do enxofre, não foi possível obter produtos de sua amplificação, mesmo depois de diversas tentativas com os *primers* escolhidos (Tabela 5).

Tabela 5: Resultado da amplificação de 3 genes funcionais.

Amostras	<i>aprAB</i>	<i>dsrAB</i>	<i>soxB</i>
HU	+	+	-
DE	+	+	-
BR	+	+	-
PF	+	+	-
BN LA	+	+	-
BN LF	+	-	-

+ resultado positivo para amplificação parcial do gene;

- resultado negativo (sem amplificação do gene).

Diante do exposto, foram selecionados para o sequenciamento apenas os produtos da amplificação parcial do gene *aprAB* por dois motivos: 1. todas as amostras sofreram amplificação e 2. por questões de restrição orçamentária do instituto de pesquisa alemão, foi escolhido o melhor resultado da amplificação de um dos genes marcadores. Posteriormente, foi realizado o alinhamento das sequências conhecidas dos principais representantes bacterianos do ciclo do enxofre pelo programa *BioEdit 7.2*, seguido do programa *Mothur* para a análise dos dados do sequenciamento. No entanto, os resultados ainda não foram finalizados, estando sob o domínio do grupo de pesquisa alemão. As próximas etapas serão definidas, a fim de refinar os resultados a nível de gênero e espécie, determinando a composição, a estrutura e abundância das principais sequências que fazem referência às bactérias oxidadoras de enxofre e redutoras de sulfato presentes nas amostras de ETEs estudadas. Os resultados obtidos a partir da análise dos dados serão utilizados para a confecção do terceiro artigo do doutorado.

## 7. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer metodologia para a detecção de sulfato. A técnica de quantificação por cromatografia iônica e o caldo inorgânico contendo tiosulfato como meio de cultivo apresentaram melhores resultados para estimar a produção de sulfato biológico a partir do *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512.

As condições não foram favoráveis para selecionar um consórcio bacteriano efetivo no controle da emissão de H<sub>2</sub>S, a fim de ser testado em um efluente de uma ETE com problema de odores, visto que os isolados selecionados não produziram quantidades significativas de sulfato biológico em relação ao controle negativo (produção de sulfato por processos abióticos).

A partir do sequenciamento de alto desempenho (*Ion Torrent*), foi possível determinar um perfil da estrutura e da composição de 6 diferentes comunidades bacterianas de cinco estações de tratamento de efluentes, associado aos diferentes padrões físico-químicos de cada sistema, a fim de determinar as principais famílias de bactérias oxidadoras de enxofre e redutoras de sulfato encontradas em amostras desses diferentes sítios de depuração da matéria orgânica.

## 8. PERSPECTIVAS

Avaliar o perfil da comunidade bacteriana do ciclo do enxofre, utilizando o gene marcador (*aprA*), sua biblioteca de clones e análise filogenética, a fim de determinar em nível de gênero ou espécie os principais grupos predominantes de BOE e BRS nas diferentes ETEs estudadas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, J. R. P.; Cabriales, J. J. P.; Veja, M. M. 2008. Identification and characterization of Sulfur-oxidizing bacteria in an artificial Wetland that treats wastewater from a tannery. **International Journal of Phytoremediation** 10: 359 – 370.

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W; Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** 25: 3389-3402.

Bartlett, J. K.; Skoog, D. A., 1954. Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons. **Analytical chemistry** 26 (6): 1008 - 1011.

Barton, L. L.; Fauque, G. D. 2009. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. **Advances in Applied Microbiology** 68: 41 – 98.

Belila, A.; Abbas, B.; Fazaa, I.; Saidi, N.; Snoussi, M.; Hassen, A.; Muyzer, G. 2013. Sulfur bacteria in wastewater stabilization ponds periodically affected by the 'red-water' phenomenon. **Applied Microbiology and Biotechnology** 97: 379–394.

Bernstein, R.; Freger, V.; Lee, J.H.; Kim, Y.G.; Lee, J.; Herzberg, M. 2014. Should I stay or should I go? Bacterial attachment vs biofilm formation on surface-modified membranes. **Biofouling** 30: 367–376.

Carrera-Chapela, F.; Donoso-Bravo, A.; Souto, J. A.; Filippi, G. R. 2014. Modeling the Odor Generation in WWTP: An Integrated Approach Review. **Water Air Soil Pollution** 225: 1 – 15.

Cattaneo, C.; Nicolella, C.; Rovatti, M. 2003. Denitrification performance of *Pseudomonas putida* in fluidized-bed biofilm reactor and in a stirred tank reactor. **Engineering in Life Sciences** 3: 579–95.

Cerqueira, Vanessa Sacramento. 2011. **Biorremediação de borra oleosa proveniente de indústria petroquímica em microcosmos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Chung, Y.C.; Huang, C. 1997. Removal of hydrogen sulphide by immobilized *Thiobacillus* sp. strain CH11 in a biofilter. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 69: 58-62.

Colmer, A. R.; Temple, K. L.; Kinckle, M. E. 1950. An iron-oxidizing bacterium from the acidic drainage of some bituminous coal mine. **Journal of Bacteriology** 59: 317 – 328.

Dahl, C.; Engels, S.; Pott-Sperling, A. S.; Schulte, A.; Sander, J.; Lubbe, Y.; Deuster, O.; Brune, D. C. 2005. Novel genes of the dsr gene cluster and evidence for close

interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. **Journal of Bacteriology** 187: 1392–1404.

Dhar, B. R.; Elbeshbishy, E.; Hafez, E.; Nakhla, G.; Ray, M. B. 2011. Thermo-oxidative pretreatment of municipal waste activated sludge for volatile sulfur compounds removal and enhanced anaerobic digestion, **Chemical Engineering Journal** 174: 166–174.

DSMZ. 2002. List of media. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gmb Germany.

Estrada, J.M.; Kraakman, N.J.R.B.; Munoz, R.; Lebrero, R. 2011. A comparative analysis of odour treatment technologies in wastewater treatment plants. **Environmental Science and Technology** 45:1100–1106.

Gall, J. L.; Xavier, A. V. 1996. Anaerobes response to oxygen: the sulfate-reducing bacteria. **Anaerobe** 2: 1–9.

Ghosh W; Dam B. 2009. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. **FEMS Microbiology Review** 33: 999–1043.

Guidotti, T.L. 2010. Hydrogen sulfide: advances in understanding human toxicity. **International Journal of Toxicology** 29: 569 – 581.

Haichar, F. Z.; Marol, C.; Berge, O.; Rangel-Castro, J. I.; Prosser, J. I.; Balesdent, J.; Heulin, T.; Achovak, W. 2008. Plant host habit and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal** 2: 1221 – 1230.

Hammer, Ø; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. 2001 PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4: 9, [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

[http://www.mte.gov.br/legislacao/normas\\_regulamentadoras/nr\\_15\\_anexo11.pdf](http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_15_anexo11.pdf).

Acesso em: 01 de maio de 2013.

Henze, M.; Harremoës, P.; Jansen, J.C.; Arvin, E. 2002. **Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes**. Springer, Verlag Berlin Heidelberg

Jensen, H.S.; Lens, P.N.L.; Nielsen, J.L.; Bester, K.; Nielsen, A.H.; Hvitved-Jacobsen, T.; Vollertsen, J. 2011. Growth kinetics of hydrogen sulfide oxidizing bacteria in corroded concrete from sewers. **Jornal of Hazardous Materials** 189: 685 – 691.

Kantachote, D.; Innuwat, W. 2004. *Isolation of Thiobacillus sp* for use in treatment of rubber sheet wastewater. **Songklanakarin Journal of Science Technology** 26 (5): 649 – 657.

Kantachote, D.; Charernjiratrakul, W.; Noparatnaraporn, N.; Oda, K. 2008. Selection of sulfur oxidizing bacterium for sulfide removal in sulfate rich wastewater to enhance biogas production. **Electronic Journal of Biotechnology** 11 (2): 107 – 118.

Kappler, U.; Dahl, C. 2001. Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation. **FEMS Microbiology Letters** 203: 1 – 9.

Kim, T.S.; Jeong, J.Y.; Wells, G.F.; Park, H.D. 2013. General and rare bacterial taxa demonstrating different temporal dynamic patterns in an activated sludge bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology** 97: 1755–1765.

Klocke, M.; Nettmann, E.; Bergmann, I.; Mundt, K.; Souidi, K.; Mumme, J.; Linke, B. 2008. Characterization of the methanogenic *Archaea* within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. **Systematic and Applied Microbiology** 31: 190–205.

Kobayashi, T.; Li, Y.; Kubota, K.; Harada, H.; Maeda, T.; Yu, H. 2012. Characterization of sulfide-oxidizing microbial mats developed inside a full-scale anaerobic digester employing biological desulfurization. **Applied Microbiology and Biotechnology** 93: 847–857.

Korzeniewska, E. 2011. Emission of bacteria and fungi in the air from wastewater treatment plants - a review. **Frontiers in Bioscience (Scholar edition)** 3: 393 – 407.

Krishnani, K. K.; Kathiravan, V.; Natarajan, M.; Kailasam, M.; Pillai, S. M. 2010. Diversity of sulfur-oxidizing bacteria in greenwater system of coastal aquaculture. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 162:1225–1237.

Kröber, M.; Bekel, T.; Diaz, N. N.; Goesmann, A.; Jaenicke, S.; Krause, L.; Miller, D.; Runte, K. J.; Viehöver, P.; Pühler, A.; Schlüter, A. 2008. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. **Journal of Biotechnology** 142: 38–49.

Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33 (7): 1870-1874.

Lafita, C.; Peña-Roja, J.M.; Sempere, F.; Waalkens, A.; Gabaldon, C. 2012. Hydrogen sulfide and odor removal by field-scale biotrickling filters: Influence of seasonal variations of load and temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part A** 47: 970 – 978.

Lamontagne, S.; Hicks, W. S.; Fitzpatrick, R. W.; Rogers, S. 2004. **Survey and description sulfidic materials in wetlands of the lower river Murray floodplain implications for floodplain salinity management**. CRC Leme Open File Reports 165, 73 p.



Lane, D. J. 1991. **16S/23S rRNA sequencing**. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Chichester, United Kingdom.

Lebrero, R.; Bouchy, L.; Stuetz, R.; Munoz, R. 2011 Odor assessment and management in wastewater treatment plants: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** 41:915–950.

Lenk, S, 2006. **Diversity and abundance of sulfur-oxidizing bacteria in wadden sea sediments revealed by DsrAB phylogeny and *dsrAB*-targeted real-time PCR**. Dissertação de Mestrado, University of Bremen, Bremen, Alemanha.

Liu, H.; Luo, G.; Hu, H.; Zhang, Q.; Yang, J.; Yao, H. 2012. Emission characteristics of nitrogen- and sulfur-containing odorous compounds during different sewage sludge chemical conditioning processes. **Journal of Hazardous Materials** 235– 236: 298– 306.

Liu, Y.; Dong, Q.; Shi, H. 2015b. Distribution and population structure characteristics of microorganisms in urban sewage. **Applied Microbiology and Biotechnology** 99 (18): 7723 - 34.

Liu, Y.; Wu, C.; Zhou, X.; Zhang, T.; Mu, L.; Shi, H. 2015a. Effect of variation of liquid condition on transformation of sulfur and carbon in the sediment of sanitary sewer. **Journal of Environmental Management** 154 (1): 65–69.

Luo, J. F.; Lin, W. T.; Guo, Y. 2011 Functional genes based analysis of sulfur-oxidizing bacteria community in sulfide removing bioreactor **Applied Microbiology and Biotechnology** 90: 769–778

Luo, J.; Tian, G.; Lin, W. 2013. Enrichment, isolation and identification of sulfur-oxidizing bacteria from sulfide removing bioreactor. **Journal of Environmental Sciences** 25 (7): 1393 – 1399.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M. 2006. Brock biology of microorganisms. NJ: Upper Sadle River.

Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere** 40 (4): 339 – 346.

McCaig, A. E.; Glove, L.A.; Pioner, J. I. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 4554 – 4559.

Meyer, B.; Imhoff, J. F.; Kuever, J. 2007. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria – evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system **Environmental Microbiology** 9(12): 2957–2977

Meyer, B.; Kuever, J. 2007. Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-59-phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfuroxidizing prokaryotes. **Microbiology** 153: 3478–3498.

Meyer, D.D.; Andrino, F. G.; Lira, Fornaro, S. P.; Fornaro, A.; Corção, G.; Brandelli, A. 2015. Sulphate production by *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512 from different sulphur substrates: sodium thiosulphate, sulphite and sulphide. **Environmental Tecnology** 37 (6): 768 – 773.

Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA 357/05. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 01 de maio de 2013. Ministério do Trabalho e Emprego. Norma regulamentadora número 15.

Mudliar, S.; Giri, B.; Padoley, K.; Satpute, D.; Dixit, R.; Bhatt, P.; Pandey, R.; Juwarkar, A.; Vaidya, A. 2010. Bioreactors for treatment of VOCs and odours - a review. **Journal of Environmental Management** 91:1039–1054.

Mukhopadhyaya, P. N.; Deb, C.; Lahiri, C.; Roy, P. 2000. A *soxA* gene, encoding a diheme cytochrome *c*, and a *sox* locus, essential for sulfur oxidation in a new sulfur lithotrophic bacterium. **Journal of Bacteriology** 182 (15): 4278–4287.

Muyzer G.; Stams, A.J.M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology** 6: 441–454.

Noyola, A.; Sagastume, J. M. M.; Hernandez, J. E. L. 2006. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy resource recovery. **Environmental Science BioTechnology** 5: 93-114.

Oh, S. E.; Hassan, S. H. A.; Van Ginkel, S. W. 2011. A novel biosensor for detecting toxicity in water using sulfur-oxidizing bacteria. **Sensor and Actuators B: Chemical** 154 (1): 17 – 21.

Petri, R., Podgorsek, L., and Imhoff, J.F. 2001. Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfateoxidizing bacteria. **FEMS Microbiology Letters** 197: 171–178.

Pokorna, D.; Zabranska, J. 2015. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. **Biotechnology Advances** 33: 1246–1259.

Rabbani, K. A.; Charles, W.; Cord-Ruwisch, R.; Ho, G. 2015. Recovery of sulphur from contaminated air in wastewater treatment plants by biofiltration: a critical review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology** 14: 523 – 534

Rattanapan, C.; Boonsawang, P.; Kantachote, D. 2009. Removal of H<sub>2</sub>S in down-flow GAC biofiltration using sulfide oxidizing bacteria from concentrated latex wastewater. **Bioresource Technology** 100: 125–130.

Ruby, E.G.; Wirsén, C.O.; Jannasch, H.W. 1981. Chemolithotrophic sulfur-oxidizing bacteria from the Galapagos Rift hydrothermal vents. **Applied and Environmental Microbiology** 42: 317–324.

Sá, L. M.; Santos, J. M.; Reis, N. C.; Gonçalves, R. F. 2005. Modelagem da emissão de sulfeto de hidrogênio proveniente de estações de tratamento de esgotos. In: **23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Campo Grande.

Sogin, M. L.; Morrison, H. G.; Herber, J. A.; Welch, D. M.; Huse, S. M.; Neal, P. R.; Anieta, J. M.; Herndl, G. J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “are biosphere”. **Proceedings of National Academy of Science of the USA** 103: 12115 – 12120.

Sorokin, D.Y.; Teske, A.; Robertson, L.A.; Kuenen, J.G. 1999. Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the *Pseudomonas stutzeri* group. **FEMS Microbiology Ecology** 30: 113–123.

Stewart, F. S.; Dmytrenko, O.; DeLong, E. F.; Cavanaugh, C. M. 2011. Metatranscriptomic analysis of sulfur oxidation genes in the endosymbiont of *Solemya velum*. **Frontiers in Microbiology** 2 (1): 1 – 10.

Stubner, S.; Wind, T.; Conrad, R. 1998. Sulfur oxidation in rice field soil: Activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate-oxidizing bacteria. **Systematic and Applied Microbiology** 21: 569–578.

Tang, K.; Baskaran, V.; Nemati, M. 2009. Bacteria of the sulphur cycle: an overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. **Biochemical Engineering Journal** 44: 73–94.

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

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. 2005. **Microbiologia**. 8ª ed. San Francisco, EUA, Benjamin Cummings, USA.

Tourna, M.; Maclean, P.; Condron, L.; O'Callaghan, M.; Wakelin, S. A. 2014. Links between sulphur oxidation and sulphur-oxidising bacteria abundance and diversity in soil microcosms based on *soxB* functional gene analysis. **FEMS Microbiology Ecology** 88 (3): 538 – 549.

Tourova, T.P.; Slobodova, N.V. Bumazhkin, B. K; Kolganova, T. V. Muyza, G.; Sorokin, D. Y. 2013. Analysis of community of sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline and soda lakes using *sox B* as a functional molecular marker. **FEMS Microbiology Ecology** 84 (2): 280 – 289.

Turner, S.; Pryer, K.M.; Miao, V.P.; Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 46(4) : 327- 38.

Valdés, F.; Camiloti, P. R.; Rodriguez, R. P.; Delforno, T. P.; Carrillo-Reyes, J.; Zaiat. M.; Jeison, D. 2016. Sulfide-oxidizing bacteria establishment in an innovative microaerobic reactor with an internal silicone membrane for sulfur recovery from wastewater. **Biodegradation** 27: 119–130.

van den Brand, T. P. H.; Roest, K.; Chen, G. H.; Brdjanovic, D. 2015 Potential for beneficial application of sulfate reducing bacteria in sulfate containing domestic wastewater treatment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 31: 1675–1681.

Vidyalakshmi, R.; Paranthaman, R.; Bhagyaraj, R. 2009. Sulphur oxidizing bacteria and pulse nutrition: a Review. **World Journal of Agricultural Sciences** 5 (3): 270-278.

Vieira-Filho M.S., Pedrotti, J.J., Fornaro, A. 2013. Contribution of long and mid-range transport on the sodium and potassium concentrations in rainwater samples, São Paulo megacity, Brazil. **Atmospheric Environment** 79: 299-307.

Wagner, M.; Roger, A.J.; Flax, J.L.; Brusseau, G.A.; Stahl, D.A. 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. **Journal of Bacteriology** 180: 2975–2982.

Wang, X.; Xia, Y.; Wen, X.; Yang, Y.; Zhou, J. 2014. Microbial Community Functional Structures in Wastewater Treatment Plants as Characterized by GeoChip. **PLOS ONE** 9 (3): 1 – 10.

Xia, S.; Duan, L.; Song, Y.; Li, J.; Piceno, M.Y.; Andersen, G.L.; Alvarez-Cohen, L.; Moreno-Andrade, I.; Huang, C.L.; Hermanowicz, S.W. 2010. Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors. **Environmental Science and Technology** 44: 7391–7396.

Xu, X. J.; Chen, C.; Guo, H.; Wang, A.; Ren, N.; Lee, D. J. 2016. Characterization of a newly isolated strain *Pseudomonas* sp. C27 for sulfide oxidation: reaction kinetics and stoichiometry. **Scientific Reports** 6 1 – 10.

Ye, L.; Zhang, T. 2013. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology** 97: 2681–2690.

Zhang, L.; De Schryver, P.; De Gussemé, B.; De Muynck, W.; Boon, N.; Verstraete, W. 2007. Chemical and biological technologies for hydrogen sulfide emission control in sewer: a review. **Water Research** 42: 1 - 12.

## 10. ANEXOS

### 10. 1 Extração de DNA para isolados bacterianos dependentes de cultivo

---

#### Série de procedimentos para a extração de DNA bacteriano

---

1. Centrifugar 2 mL de cultura bacteriana obtida do crescimento *overnight* por 10 min. a 20000g;
  2. Descartar sobrenadante;
  3. Ressuspender *pellet* em 500 uL de TE;
  4. Adicionar 10 µL de SDS 10% e 1 g de *beads*;
  5. Submeter a vórtex por 15 min.;
  6. Acrescentar 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1);
  7. Centrifugar por 5 min. a 20000 g;
  8. Retirar o sobrenadante (450 µL) e transferir para um tubo novo);
  9. Acrescentar 40 µL de acetato de sódio 5M pH 5,2;
  10. Acrescentar 400 µL de isopropanol e agitar;
  11. Deixar sob o gelo por 5 min.;
  12. Centrifugar por 5 min. a 20000 g;
  13. Descartar o sobrenadante gentilmente;
  14. Acrescentar 500 µL de etanol 70% gelado;
  15. Centrifugar por 2 mim. a 20000 g;
  16. Descartar o sobrenadante gentilmente e deixar secar à temperatura ambiente;
  17. Ressuspender o pellet em 50 µL em H<sub>2</sub>O e armazenar à temperatura de 4°C por 24 h;
  18. Migrar o DNA em gel de agarose 1% e depois armazenar o DNA em temperatura de -20°C.
-

## 11. APÊNDICES

11.1 sequências de nucleotídeos de 13 isolados bacterianos obtidas por sequenciamento parcial do gene 16S do RNAr.

### HU1 (583 pb)

GATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTC  
GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCG  
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT  
GACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTG  
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCG  
CAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTG  
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCT  
ACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATC  
CCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAAT  
CGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC

### HU5 (556 pb)

AGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG  
GTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT  
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGA  
TTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCT  
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACTTC  
GGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT  
CAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAA  
GGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGC  
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCAC  
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC

### DE1 (560 pb)

CGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGT  
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCG  
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCC  
TTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGT  
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGC  
GCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGT



GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGG  
CTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAA  
TCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGG  
AATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAA

**BR5 (491 pb)**

GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGA  
GATAGGACGTCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC  
ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA  
AAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATC  
GCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC  
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT

**BN1 (498 pb)**

TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG  
GTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCT  
GAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGG  
CTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT  
GTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCG  
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGT  
GCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAA  
CCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGT  
AATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT

**BN2 (478 pb)**

TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG  
GTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCT  
GAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGG  
CTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTT  
GTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCG  
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGT  
GCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAA

CCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGT  
AATCGTGAATCAG

**BN3 (440 pb)**

TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGC  
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGC  
TGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATG  
GCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCT  
TGTCCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACC  
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACAC  
GTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAA  
AACCGATCGTATTCCGGATCGCAGTCTGCAACTC

**BN4 (548 pb)**

TTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA  
AACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAA  
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGG  
TGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTTCAGCTCGTGTTCGTGAGA  
TGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCACGTAATGG  
TGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
GTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGG  
TTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGT  
CTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGT  
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA

**BN5 (642 pb)**

ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGTTCC  
TTGAGAACTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGC  
AAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT  
AATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGA  
TGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTTCAGCTCGTG  
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTTAGTTACCAGCA  
CGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT  
GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGT  
ACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGG  
ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAAT

GTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGG  
G

**BN6 (396 pb)**

GAACTTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCT  
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGT  
CCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA  
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGC  
TACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACC  
GATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT  
CGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC

***Paracoccus pantotrophus* (ATCC 35512) (334 pb)**

TTTCACTTCGGTGACCTGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA  
GATGTTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTCTTAGTTGCCAGCATTGGT  
TGGGCACTCTAAGAGAACTGCCGATGATAAGTCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAG  
TCCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGT  
TAATCCCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTTG  
GAATCGCTAGT AATCGCGGAACAGCATGCCGCGGTGAATACG