

André Ferreira de Sousa

Identificação, caracterização e estudo do crescimento e da
capacidade de desnitrificação de uma bactéria marinha isolada de
um filtro biológico

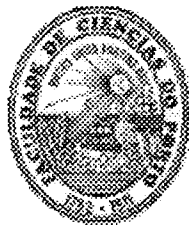


Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2004

André Ferreira de Sousa

Identificação, caracterização e estudo do crescimento e da
capacidade de desnitrificação de uma bactéria marinha isolada de
um filtro biológico

**Dissertação de Mestrado em Ecologia
Aplicada apresentada à Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto**



Porto 2004

«Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos
do mundo.»

Álvaro de Campos - *Tabacaria*

Aos meus Pais,
Aqueles que me ensinaram
A sonhar

Agradecimentos

À Professora Doutora Teresa Borges do Departamento de Zoologia e Antropologia da F.C.U.P. que foi para mim um exemplo de competência científica e sobretudo humana. A sua persistência, seriedade e muita paciência tornaram possível a conclusão deste trabalho.

À Professora Doutora Paula Castro da Escola ~~Superior~~ de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto por ter aceitado a co-orientação deste trabalho e por todo o investimento no mesmo.

Ao Doutor Paolo de Marco do Instituto de Biologia Celular e Molecular da Universidade do Porto pela preciosa ajuda e acompanhamento na identificação fenotípica e molecular do organismo desnitrificante em estudo.

À Professora Doutora Lúcia Guilhermino do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental pela colaboração prestada.

Ao Professor Doutor Vítor Vasconcelos do Departamento de Zoologia e Antropologia da F.C.U.P. pela colaboração prestada.

Ao Professor Doutor Adriano Bordalo do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto e à sua aluna de Doutoramento Mestre Catarina Magalhães pela disponibilidade e prestação de informações sobre o método usado para doseamento de nitratos e nitritos.

À investigadora Petra Hönigová da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto (Programa de Mobilidade Sócrates/Erasmus) pelo isolamento da bactéria T2 e pela realização do Teste API 20 NE.

Aos investigadores da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto, Rui Oliveira, Fátima Carvalho, Albina Franco, Maria Pajuelo e Filipa Mendes, por todos os ensinamentos, pelo apoio e entusiasmo em todo o desenrolar deste trabalho.

Ao Professor Artur Torres do Colégio Internato dos Carvalhos pelos conselhos e sugestões que me ajudaram a ultrapassar alguns obstáculos.

Ao meu amigo Raul Emílio, que sem o seu incentivo, companheirismo e amizade não teria sido possível concluir esta tarefa.

O uso de sistemas de recirculação e de reutilização de água em aquacultura constitui uma alternativa mais ecológica aos sistemas tradicionais em circuito aberto. Um dos maiores problemas e requisitos destes sistemas é a remoção dos nutrientes inorgânicos, nomeadamente dos nitratos. A remoção dos nitratos pode ser realizada através de métodos físico-químicos e biológicos. A desnitrificação biológica pode oferecer uma remoção eficiente e mais económica deste nutriente.

Este trabalho teve como objectivo caracterizar e descrever um organismo desnitrificante isolado de uma piscicultura marinha, identificado como pertencente ao género *Pseudomonas* encontrando-se, segundo a análise do gene 16S rRNA efectuada, muito próxima de *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas libanensis*, *Pseudomonas reactans* e *Pseudomonas fluorescens*.

Foi avaliado o efeito dos parâmetros oxigénio dissolvido, salinidade, fontes de carbono, razão C/N e temperatura no crescimento e efectuada uma avaliação da capacidade de desnitrificação deste microrganismo.

Em condições aeróbias e a uma temperatura de 25 °C a presença de NaCl no meio não pareceu afectar o crescimento bacteriano, mas a uma temperatura de 30 °C a biomassa formada atingiu 423 e 276 mg/L, sem e com 2,8 % de NaCl, respectivamente. Para estas temperaturas as taxas de crescimento variaram entre 0,12-0,17 h⁻¹ e 0,22-0,28 h⁻¹, respectivamente.

De entre as fontes de carbono testadas com meio mínimo os melhores resultados obtiveram-se com o extracto de levedura, tanto em condições aeróbias como em anoxia, tendo a taxa de crescimento com este substrato variado entre 0,05-0,13 h⁻¹. O microrganismo estudado apresentou comportamentos semelhantes com a glucose e o acetato de sódio e em condições anóxicas as taxas de crescimento variaram entre 0,02 h⁻¹ (razão C/N=2.0) e 0,04 h⁻¹ (razão C/N=1.0). O crescimento com metanol, em condições anóxicas, para razões C/N de 1 e de 2 foi pouco significativo. Em condições aeróbias as taxas de crescimento duplicaram relativamente às observadas em anaerobiose para qualquer uma das fontes de carbono testadas.

Num meio com peptona, com uma salinidade de 2,8 % e com uma concentração de 300 mg/L de N-NO₃⁻ a taxa específica de redução do N-NO₃⁻ variou entre 1,2 e 10,4 mg N-NO₃⁻/(g biomassa.h) e a taxa específica de redução do N-NO₂⁻ variou entre 2 e 5,6 mg N-NO₂⁻/(g biomassa.h). O azoto sob estas formas foi totalmente reduzido em menos de 40 horas, apesar de ter ocorrido uma acumulação temporária de nitrito. O processo de desnitrificação foi mais eficiente quando o microrganismo cresceu num meio mínimo com uma concentração de 40 mg/L de N-NO₃⁻, não ocorrendo acumulação de N-NO₂⁻. Neste caso, a taxa específica de redução de N-NO₃⁻ foi 13,0 mg N-NO₃⁻/(g biomassa.h) e a taxa específica de redução do N-NO₂⁻ foi 8,20 mg N-NO₂⁻/(g biomassa.h). Estes compostos foram totalmente reduzidos em menos de 25 horas.

A capacidade de adsorção da bactéria aos suportes carvão activado granular, argila expandida (leca) e anéis de acrílico foi avaliada a partir da quantificação das bactérias presentes no sobrenadante de culturas expostas aos materiais e das bactérias presentes nos respectivos suportes. Verificou-se que o carvão activado foi aquele onde ocorreu uma maior adsorção, seguido da leca e dos anéis de acrílico.

The use of systems of water re-circulation and re-use in aquaculture constitutes a more ecological alternative to the traditional systems in open circuit. One of the biggest problems and requisites of these systems is the removal of inorganic nutrients, namely nitrates. The removal of nitrates can be done through physico-chemical and biological methods. The biological denitrification offers a more efficient and economic removal of this nutrient.

The aim of this work was to characterize and to describe a denitrifying organism, isolated from a marine fish farm, identified as belonging to the genus *Pseudomonas*, being, according to the analysis of the gene 16S rRNA, closely related to *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas libanensis*, *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas fluorescens*.

It was evaluated the influence of factors dissolved oxygen, salinity, carbon sources, C/N ratios and temperature on its growth and the denitrification capacity of this microorganism was also assessed.

In aerobic conditions and with a temperature of 25 °C the presence of NaCl in the culture medium was not determining in terms of bacterial growth, but with a temperature of 30 °C the formed biomass reached 423 and 276 mg/L, without and with 2,8 % of NaCl respectively. Within these temperatures, the growth rates varied between 0,12-0,17 h⁻¹ and 0,22-0,28 h⁻¹ respectively.

Among the carbon sources assayed in minimal medium the best results were obtained with the yeast extract either in aerobic conditions or in anoxia, having the growth rate ranged from 0,05 to 0,13 h⁻¹ with this substrate. The microorganism presented similar results with glucose and sodium acetate and in anoxic conditions the growth rates ranged from 0,02 h⁻¹ (for C/N=2.0) and 0,04 h⁻¹ (for C/N=1.0). The growth with methanol, in anoxic conditions, and C/N ratios of 1 and 2, was less significative. In aerobic conditions the growth rates doubled comparatively to the ones observed in anaerobiosis with all tested carbon sources.

Using a medium enriched with peptone, a salinity of 2,8 % and a concentration of 300 mg/L of N-NO₃⁻ the specific N-NO₃⁻ reduction rate varied between 1,2 and 10,4 mg N-NO₃⁻/(g biomass.h) and the specific reduction rate of N-NO₂⁻ varied between 2 and 5,6 mg N-NO₂⁻/(g biomass.h). These nitrogenous compounds were completely reduced in less than 40 hours, though a transient accumulation of nitrite was observed. The denitrification process was more efficient when the bacteria grew in a minimal medium with a concentration of 40 mg/L of N-NO₃⁻. In this case there was no N-NO₂⁻ accumulation and the observed specific reduction rates were 13,0 mg N-NO₃⁻/(g biomassa. h) for nitrate and 8,20 mg N-NO₂⁻/(g biomass.h) for nitrite. These compounds were completely reduced in less than 25 hours.

The bacteria adsorption capacity to granular activated carbon, light expanded clay aggregates and acrylic rings was evaluated from the quantification of suspended bacteria in cultures exposed to these materials and of the bacteria present on the respective supports. It was observed that the activated carbon was the one where a higher adsorption occurred, followed by the light expanded clay aggregates and the acrylic rings.

L'usage de systèmes de recirculation et de réutilisation de l'eau en aquaculture constitue une option plus écologique par rapport aux systèmes traditionnels en circuit ouvert. Un des plus grand problèmes et demandes des ces systèmes c'est la remotion des nutriments inorganiques ou plus précisément des nitrates. La remotion des nitrates peut être réalisé à travers des méthodes physico-chimiques et biologiques. La dénitrification biologique peut offrir une remotion efficace et plus économique de ces nutriments.

Ce travail a eu comme objectif caractériser et décrire un organisme dénitrifiant isolé d'une pisciculture marine, identifié comme lié au genre *Pseudomonas* et, d'accord avec l'analyse du gène 16S rRNA effectué, très proche de *Pseudomonas gessardii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas libanensis*, *Pseudomonas reactans* et *Pseudomonas fluorescens*.

On a aussi évalué l'effet des paramètres oxygène dissous, salinité, sources de carbone, raison C/N et température dans la croissance et on a effectué une évaluation de la capacité de dénitrification de cet organisme.

Dans les conditions aérobiques et à une température de 25 °C la présence de NaCl dans le milieu de culture ne semble pas affecter la croissance bactérienne, mais à une température de 30 °C la biomasse formée a atteint 423 et 276 mg/L, sans et avec 2,8 % de NaCl respectivement. Pour ces températures les taux de croissance ont varié entre 0,12-0,17 h⁻¹ et 0,22-0,28 h⁻¹ respectivement.

Parmi les sources de carbone testées en milieu minimum les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'extract de levure soit dans les conditions aérobiques soit en anoxie et le taux de croissance avec ce substrat a varié entre 0,05-0,13 h⁻¹. Le microorganisme étudié a présenté des comportements semblables avec la glycose et acétate de sodium et en conditions anoxiques les taux de croissance ont varié entre 0,02-0,04 h⁻¹, pour les raisons C/N de 1 et de 2. La croissance avec méthanol en conditions anoxiques, pour une raison C/N 1 et 2 a été peu significative. En conditions aérobiques les taux de croissance ont doublé dans un milieu avec peptone comparativement aux résultats en anaérobiose pour toutes les sources de carbone essayées.

Dans un milieu avec peptone, une salinité de 2,8 % et une concentration de 300 mg/L de N-NO₃⁻, le taux spécifique de réduction de N-NO₃⁻ a varié entre 1,2 et 10,4 mg N-NO₃⁻/(g biomasse.h) et le taux spécifique de réduction de N-NO₂⁻ a varié entre 2 et 5,6 mg N-NO₂⁻/(g biomasse.h). L'azote sur ces formes a été totalement réduit en moins de 40 heures, malgré l'accumulation temporaire de nitrite. Le processus de dénitrification a été plus efficace quand le microorganisme a été cultivé dans un milieu minimum avec une concentration de N-NO₃⁻ de 40 mg/L. Dans ce cas-là il n'y a pas eu une accumulation de N-NO₂⁻ et le taux spécifique de réduction de N-NO₃⁻ a été de 13,0 mg N-NO₃⁻/(g biomasse.h) et le taux spécifique de réduction de N-NO₂⁻ a été de 8,20 mg N-NO₂⁻/(g biomasse.h). Ces composés ont été totalement réduits en moins de 25 heures.

La capacité d'adsorption de la bactérie aux supports de charbon activé granulé, leca (« light expanded clay aggregates ») et des anneaux d'acrylique a été évaluée à partir de la quantification des bactéries présentes en suspension dans des cultures exposées à ces matériaux et des bactéries présentes dans les respectifs supports. On a vérifié que le charbon activé a été celui où on a constaté la plus grande adsorption, suivi de la leca et des anneaux d'acrylique.

Figura 1. Morfologia macroscópica das colónias da bactéria T2	29
Figura 2. Relações filogenéticas baseadas nas sequências do gene 16S rRNA entre organismos pertencentes ao género <i>Pseudomonas</i> e a estirpe T2. Barra = 0.1 Knuc (taxa de substituição nucleotídica). <i>E.coli</i> foi usada como “outgroup” para a árvore filogenética	33
Figura 3. Crescimento observado com e sem NaCl a uma temperatura de 25 °C, em meio com peptona e em anaerobiose	34
Figura 4. Crescimento observado com e sem NaCl a uma temperatura de 30 °C, em meio com peptona e em aerobiose	35
Figura 5. Crescimento observado em meio com peptona e meio mínimo (com extracto de levedura) ambos com 1g KNO ₃ /L, a 2,8 % de NaCl, a uma temperatura de 25 °C, em anaerobiose	36
Figura 6. Resultado do ensaio realizado em meio com peptona e 2,8 % de NaCl, em anaerobiose, mas sem KNO ₃ , a 25 °C.....	37
Figura 7. Biomassa (mg/L) formada em condições anaeróbias, à temperatura de 25 °C, em meio mínimo e uma razão C/N = 1.0, para as seguintes fontes de carbono: glucose, acetato, metanol, levedura	38
Figura 8. Biomassa (mg/L) formada, usando meio mínimo, à temperatura de 25 °C, em condições anaeróbias com uma razão C/N = 2.0 e com as seguintes fontes de carbono: glucose, acetato, metanol, levedura. Como controlo foi usado meio mínimo sem qualquer fonte de carbono	39
Figura 9. Biomassa (mg/L) formada usando meio mínimo, à temperatura de 25 °C, em condições aeróbias com uma razão C/N=1.0, com as seguintes fontes de carbono: glucose, acetato, metanol, levedura. Como controlo foi usado meio mínimo sem qualquer fonte de carbono.....	40
Figura 10. Exemplo do perfil evolutivo de N-NO ₃ ⁻ e de N-NO ₂ ⁻ (a) e da biomassa (b) num meio com peptona e com 300 mg N-NO ₃ ⁻ /L, a uma temperatura de 25 °C	41
Figura 11. Perfil evolutivo de N-NO ₃ ⁻ e de N-NO ₂ ⁻ (a) e da biomassa (b) em meio mínimo com 40 mg/L N-NO ₃ ⁻ /L, a temperatura ambiente de 25 °C.....	42

Figura 12. Perfil evolutivo de N-NO_3^- (a) e da biomassa (b) num meio mínimo com 40 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ e extracto de levedura, a uma temperatura controlada de 30 °C	43
Figura 13. Variação da biomassa (mg/L) observada no sobrenadante das suspensões com cada um dos 3 materiais em estudo (carvão, leca, acrílico) e no controlo, ao longo do tempo experimental	44
Figura 14. Valor de U.F.C./ml no sobrenadante das suspensões com cada um dos 3 materiais em estudo (carvão, leca, acrílico) e no controlo	44
Figura 15. Valores observados de U.F.C./g de substrato (carvão, leca e acrílico)	45

Tabela 1. Características fisiológicas e bioquímicas da bactéria T2	30
Tabela 2. Taxas de crescimento (h^{-1}) obtidas em meio mínimo com levedura, glicose, acetato e metanol. No controlo não se usou fonte de carbono	38
Tabela 3. Caracterização do processo de desnitrificação anaeróbia, em meio com peptona e em meio mínimo com 0,3 e 1 g de KNO_3/L , a 25 e 30 °C	41
Tabela 4. Valores da cinética da desnitrificação referenciados na literatura consultada e no presente trabalho	54

1 - Introdução

1.1. O nitrato como poluente aquático.....	1
1.2. As pisciculturas e o controlo de qualidade da água.....	2
1.3. Métodos biológicos de remoção dos nitratos.....	3
1.4. O processo de desnitrificação.....	4
1.5. Os microrganismos desnitrificantes.....	5
1.6. Factores que influenciam a desnitrificação.....	6
1.6.1. Fontes de carbono.....	6
1.6.2. Oxigénio dissolvido.....	7
1.6.3. Razão C/N.....	8
1.6.4. Salinidade.....	9
1.6.5. pH	9
1.6.6. Concentração de nitrato e nitrito.....	10
1.6.6. Temperatura.....	10
1.7. Âmbito e objectivos do trabalho efectuado.....	11

2 - Material e métodos

2.1. Isolamento do organismo desnitrificante.....	12
2.2. Identificação e caracterização da bactéria isolada.....	13
2.2.1. Caracterização preliminar da bactéria.....	13
2.2.1.1. Teste de Gram.....	13
2.2.1.2. Teste da Catalase.....	13
2.2.1.3. Teste da Oxidase.....	13
2.2.1.4. Teste API 20 NE (BioMérieux).....	14
2.2.2. Testes complementares.....	14
2.2.2.1. Crescimento em Agar Específico para <i>Pseudomonas</i> (PAB).....	14
2.2.2.2. Teste de Fluorescência.....	15
2.2.2.3. Teste da Gelatinase.....	15
2.2.2.4. Teste da Arginina Dihidrolase.....	15
2.2.2.5. Crescimento a 41 °C.....	16

2.2.2.6. Teste Hemolítico.....	16
2.2.3. Estudo preliminar da capacidade de desnitrificação.....	16
2.2.4. Análise dos Ácidos Gordos Celulares.....	17
2.2.5. Métodos Moleculares de Identificação - amplificação e sequenciação do gene 16S rRNA.....	17
2.3. Manuseamento das culturas.....	18
2.3.1. Teste de pureza.....	18
2.3.2. Congelamento de culturas.....	18
2.3.3. Recuperação de culturas.....	18
2.3.4. Meios de cultura utilizados.....	19
2.3.5. Metodologia usada para obtenção de condições aeróbias.....	21
2.3.6. Metodologia usada para obtenção de condições anaeróbias.....	21
2.3.7. Avaliação do crescimento bacteriano.....	21
2.4. Ensaios de crescimento efectuados.....	22
2.4.1. Avaliação da influência da salinidade em condições aeróbias.....	22
2.4.2. Avaliação do crescimento com meio com peptona e em meio mínimo suplementado, em anaerobiose.....	23
2.4.3. Avaliação do crescimento, em condições anaeróbias, com diferentes fontes de carbono e razões C/N.....	23
2.5. Caracterização do processo de desnitrificação.....	24
2.6. Estudo da adsorção a diferentes matrizes.....	24
2.7. Técnicas analíticas usadas e suas adaptações.....	25
2.7.1. Avaliação de possíveis interferências com as técnicas usadas.....	26
2.7.2. Determinação de nitratos.....	27
2.7.3. Determinação de nitritos.....	28
2.8. Tratamento estatístico efectuado.....	28

3. Resultados

3.1. Caracterização da bactéria estudada.....	29
3.1.1. Características fenotípicas.....	29

3.1.2. Testes complementares de caracterização.....	31
3.1.3. Estudo preliminar da capacidade de desnitrificação.....	31
3.1.4. Análise dos Ácidos Gordos Celulares.....	32
3.1.5. Sequenciação do gene 16S rRNA e análise filogenética.....	32
3.2. Ensaio de crescimento.....	34
3.2.1. Avaliação da influência da salinidade em aerobiose.....	34
3.2.2. Avaliação do crescimento em meio com peptona e em meio mínimo, em anaerobiose.....	36
3.2.3. Avaliação do crescimento com diferentes fontes de carbono e razões C/N.....	37
3.3. Caracterização do processo de desnitrificação.....	40
3.4. Estudo da adsorção a diferentes matrizes.....	43
3.5. Técnicas analíticas usadas e suas adaptações.....	45
3.5.1. Avaliação de possíveis interferências com as técnicas usadas.....	45
4. Discussão	
4.1. Descrição da bactéria T2.....	47
4.2. Características de crescimento da <i>Pseudomonas</i> isolada.....	49
4.3. Caracterização do processo de desnitrificação.....	51
4.4. Estudo da adsorção.....	55
5. Considerações finais	57
6. Bibliografia	59
7. Anexos	67
Anexo 1. Exemplo de recta de calibração para determinação da biomassa....	68
Anexo 2. Exemplo de rectas de calibração para doseamento de nitratos e de nitritos.....	69
Anexo 3. Sequências do gene 16S rRNA da bactéria T2 e das estirpes bacterianas mais próximas, de acordo com a análise filogenética efectuada..	70

1 – Introdução

1.1. O nitrato como poluente aquático

A presença de nitrato na água superficial e na água subterrânea, tem aumentado nos últimos anos tanto na Europa como nos Estados Unidos. O nitrato é a causa principal da doença designada por metanoglobina que ocorre principalmente nas crianças e pode originar malformações congénitas, suspeitando-se ainda que a redução do nitrato e consequente formação de nitrosaminas no estômago pode provocar o cancro (Wisniewski et al., 2001). A remoção de nutrientes, nomeadamente do nitrato, das águas residuais e da água para consumo tornou-se obrigatória. A legislação existente na Europa e nos Estados Unidos determina como valores máximos de nitrato na água para consumo humano, 12 mg/L e 10 mg/L, respectivamente (Glass e Silverstein, 1998). O mesmo sucede em Portugal, cuja legislação define parâmetros de qualidade da água em função da sua utilização e impõe limites nas descargas de efluentes (D.L. 236/98 e D.L. 152/97).

A eutrofização das águas subterrâneas por contaminação com nitratos está na origem de sérios problema sociais e económicos (Gomez et al., 2002). Para este processo contribui a agricultura, devido à aplicação generalizada de fertilizantes, que são uma fonte importante de contaminação por lixiviação (Wasik et al., 2001). O nitrato é muito solúvel em água e é facilmente transportado tanto para as águas subterrâneas como para as águas superficiais.

Por outro lado, quantidades elevadas de nitrato são encontradas nos efluentes das indústrias do celofane, de explosivos, fertilizantes, pectina, metalurgia e mesmo na indústria nuclear referenciando-se, por exemplo, nestes efluentes, quantidades de nitrato superiores a 1000 mg/L (Glass e Silverstein, 1998).

Outro sector de actividade cujo impacto ambiental se tem acentuado nos últimos anos é a piscicultura, devido à sua grande expansão. Esta actividade aquícola produz resíduos (sólidos e nutrientes) em resultado dos produtos de excreção libertados pelos peixes e das perdas de alimento não ingerido (van Rijn, 1996). O controlo da qualidade da água é a chave para o sucesso deste tipo de actividade.

1.2. As pisciculturas e o controlo da qualidade da água

A maioria das pisciculturas funciona em sistema “aberto” o que conduz a dois problemas principais: (1) consumo elevado de energia para bombeamento da água; (2) grande quantidade de água poluída libertada para o meio ambiente. Estas pisciculturas encontram-se normalmente em regiões com um amplo fornecimento de água não contaminada (van Rijn et al., 1996). Em alternativa, existe um segundo método de produção que funciona em sistema “fechado”, com recirculação da água, o que permite diminuir o consumo desta e a poluição associada (Sauthier et al., 1998), pois os sistemas de recirculação incorporam estratégias para manter a qualidade da água. Por isso, estes sistemas são mais ecológicos, pois menos água é consumida e só uma pequena parte é descarregada após tratamento (van Rijn, 1996).

Os problemas mais comuns na qualidade da água nestes sistemas são: a diminuição do oxigénio dissolvido, a elevada concentração do CO₂, a acumulação de matéria orgânica e de azoto inorgânico, em especial de amónio e de nitrito, que são tóxicos para os peixes em determinadas concentrações. Com efeito, muitos organismos aquáticos, incluindo os peixes, apresentam uma toxicidade crónica para concentrações de amónio e nitrito da ordem de 10⁻³ g/L. No entanto, as mesmas espécies conseguem tolerar concentrações de nitrato até 50 mg/L (Lee et al., 2000). Por isso, nos sistemas intensivos de aquacultura, os nitratos têm sido considerados pouco tóxicos para a saúde dos peixes e por isso poucos estudos têm sido realizados sobre a remoção de nitratos nestes sistemas (Aboutboul et al., 1995). No entanto, uma concentração elevada de nitrato deve ser evitada devido à possibilidade de acumulação de nitritos e devido aos limites impostos pela legislação quanto às descargas dos efluentes (Aboutboul et al., 1995). Deste modo, um dos aspectos a estudar nos sistemas de recirculação é a acumulação de nitratos e a sua posterior remoção.

Uma piscicultura com recirculação da água apresenta normalmente um sistema de tratamento com os seguintes componentes: tanques para peixes, onde ocorre o crescimento dos mesmos; um separador de partículas que remove fezes e restos de alimento não ingerido; um filtro mecânico (50 µm de malha) que remove pequenas partículas; uma coluna empacotada que remove o CO₂ e mantém o pH estável; por vezes uma unidade de desinfecção por ultra-violetas, que controla o crescimento bacteriano no sistema e um filtro biológico que reduz o amónio a nitrato (Leonard et al., 2002).

Existem, contudo, dois obstáculos fundamentais que dificultam a implementação generalizada desta tecnologia. Em primeiro lugar, o custo efectivo dos diferentes componentes do sistema. Em segundo lugar, as estratégias de gestão até agora usadas não têm encorajado a adopção de novas tecnologias por esta indústria. Por estes motivos, muitos aquacultores acreditam que a tecnologia de recirculação é demasiado cara para a cultura da maior parte das espécies (Lee et al., 2000). Acresce a este panorama o facto de, até agora, as pisciculturas marinhas com recirculação terem sido um fracasso económico, devido a falhas no desenho técnico dos sistemas de produção e de tratamento de água ou devido a operações incorrectas dos mesmos (Blancheton, 2000).

Sendo assim, a aplicação desta tecnologia às actuais pisciculturas requer um enorme esforço para ultrapassar o problema de mudança de escala de todos os componentes do sistema global de produção. Esta questão é ainda mais notória quando se aborda a problemática dos sistemas de recirculação nas pisciculturas marinhas, para as quais existem poucas aplicações comerciais devido ao facto de os peixes de água salgada serem mais sensíveis à produção com reciclagem total da água (Blancheton, 2000).

Por estas razões, a remoção dos poluentes em água salgada deve ser ainda mais aperfeiçoada, de modo a promover uma eliminação o mais completa possível dos mesmos.

1.3. Métodos biológicos de remoção dos nitratos

Um dos maiores problemas da aquacultura moderna, no que concerne à tecnologia de biofiltração e ao avanço na tecnologia da recirculação, é o custo efectivo da remoção do nitrato (Menasveta et al., 2001). O nitrato pode ser removido usando métodos físico-químicos ou biológicos (Metcalf e Eddy, 2003).

Os três principais processos físico-químicos usados na remoção de nitratos são: a troca iónica, a osmose reversa e a electrodialise. Estes processos são eficientes na remoção de vários iões e sais específicos, mas de custo elevado. Por outro lado, produzem grandes quantidades de “resíduos” que são constituídos por grandes concentrações de nitratos e por outros iões presentes na água (cloro, sulfato, hidrogenocarbonato) (Wisniewski et al., 2001).

Já a remoção biológica de nitratos tem demonstrado ser um método mais avançado, selectivo e sobretudo mais económico do que os métodos físico-químicos (Loukidou e

Zouboulis, 2001; Metcalf e Eddy, 2003). As vantagens económicas resultam sobretudo da redução do consumo de alcalinidade e das necessidades em arejamento (Kornaros e Lyberatos, 1997), porque a desnitrificação biológica conduz a uma subida do pH e ocorre em anoxia.

Os principais processos biológicos usados no tratamento de águas podem ser divididos em duas grandes categorias: tratamento com biomassa suspensa ou tratamento com biomassa fixa. Nos processos de biomassa suspensa, os microrganismos responsáveis pelo tratamento são mantidos em suspensão por processos apropriados de mistura. No processo de biomassa fixa os microrganismos responsáveis pelo biotratamento de poluentes, como o nitrato, estão aderidos a um material inerte formando um biofilme. Os materiais usados como suporte bacteriano incluem rochas, cascalho, areia e vários tipos de plástico e outros materiais sintéticos (Metcalf e Eddy, 2003).

1.4. O processo de desnitrificação

Nos processos biológicos, a remoção de nitrato pode ocorrer de dois modos: através da assimilação do nitrato ou pela via dissimilatória do nitrato. A via assimilatória envolve a redução do nitrato até amónio, que é utilizado para a síntese celular. Este processo acontece quando o amónio não está disponível e não existe uma dependência da concentração de oxigénio. Por outro lado, a via dissimilatória ou desnitrificação biológica está associada à cadeia respiratória de transporte de electrões (Metcalf e Eddy, 2003).

A desnitrificação biológica é um processo mediado por bactérias heterotróficas. As bactérias desnitrificantes são na sua maioria anaeróbias facultativas que se encontram distribuídas com uma grande ubiquidade no solo e na água (Wasik et al., 2001). Estas bactérias usam substâncias orgânicas como fonte de carbono e energia, e utilizam como aceitador de electrões, por ordem de preferência, oxigénio dissolvido, nitrato e sulfato (Sauthier et al., 1998). A desnitrificação produz menos energia do que a respiração aeróbia, levando a um crescimento microbiano mais lento. No entanto, na ausência de oxigénio, o nitrato torna-se o aceitador de electrões preferencial transformando-se em nitrito. Em presença de um dador de electrões (carbono) em excesso, o nitrito também serve de aceitador de electrões e é convertido em primeiro lugar, em óxido nítrico (NO), depois em óxido nitroso (N₂O) e posteriormente em azoto molecular (N₂) (Menasveta et al., 2001). Há autores ainda (Nurse, 1980; Rhee et al. 1997), que consideram que o

óxido nitroso pode também ser utilizado como receptor de electrões. Este conjunto de passos é mediado por quatro enzimas: nitrato redutase, nitrito redutase, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase. Este processo também é conhecido por redução dissimilatória do nitrato (Prescott et al., 2002).

1.5. Os microrganismos desnitrificantes

Existem algumas incertezas sobre as bactérias que estão envolvidas na desnitrificação dos efluentes industriais, assim como sobre a contribuição das mesmas para a redução do nitrato e nitrito em condições anóxicas (Drysdale et al., 1999). É mais ou menos consensual que os organismos pertencentes ao género *Pseudomonas* são os microrganismos predominantes neste processo (Drysdale et al., 1999). No entanto, outras espécies heterotróficas contribuem para o mesmo como, por exemplo, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Vibrio* e outros (Drysdale et al., 1999). No entanto, muitas delas não concluem o processo, isto é, apenas reduzem o nitrato a nitrito. Outras completam a desnitrificação, pois possuem as enzimas nitrato e nitrito redutase, mas com uma taxa de desnitrificação muito lenta.

O género *Pseudomonas* abrange um grupo de organismos com um metabolismo muito versátil e com uma grande ubiquidade tanto no solo como na água (Gogfrey et al., 2001). No entanto, a identificação das bactérias pertencentes a este grupo não é fácil e muitas vezes fica limitada ao género, não se conseguindo realizar uma caracterização total (Johnsen et al., 1996; Tryfinopoulos et al., 2002).

Por outro lado, a maior parte dos estudos sobre cinética da desnitrificação, realizados com consórcios bacterianos, são muitas vezes mal definidos. A rentabilização dos sistemas de desnitrificação apresenta sérias dificuldades devido às interações entre as várias espécies bacterianas e substratos usados e ao facto de a reprodução dos resultados experimentais ser quase impossível. Por exemplo, Martienssen e Schops (1997) descobriram diferenças nas taxas de desnitrificação da ordem dos 900 % usando suspensões de efluentes provenientes de vários sistemas de lamas activadas. As diferenças também se fizeram notar em estudos experimentais sobre a desnitrificação com diferentes efluentes e estes autores verificaram ainda que havia grandes diferenças nas concentrações de nitritos acumulados, nas mesmas condições. Por outro lado, um modelo baseado em estudos com culturas puras e com um meio bem definido permite

determinar o efeito de vários parâmetros (razão C/N, concentração de oxigénio dissolvido e outros) directamente no processo de desnitrificação, assim como permite conhecer as condições que levam à acumulação de nitritos (Marazioti et al., 2003).

No que respeita à indústria da aquacultura poucos estudos têm sido realizados sobre as bactérias não patogénicas presentes nestes sistemas, incluindo as bactérias desnitrificantes, especialmente em pisciculturas de água salgada com recirculação (Borges et al., 2003). Também se verifica que a maior parte dos estudos efectuados têm um carácter experimental e não se aplicam directamente à realidade dos sistemas de aquacultura (Leonard et al., 2000).

1.6. Factores que influenciam a desnitrificação

Para aumentar a eficiência da desnitrificação biológica no tratamento de águas residuais tem de haver um controlo de alguns parâmetros, tais como a fonte de carbono disponível, o oxigénio dissolvido no efluente, a razão C/N, a salinidade, o pH, a concentração de nitratos e nitritos no meio e a temperatura (Martienssen e Shcops, 1997; Metcalf e Eddy, 2003; Gomez et al., 2002). O processo de desnitrificação biológica se não for bem controlado pode levar à acumulação de nitritos, os quais, conforme anteriormente referido, são altamente tóxicos para os peixes, para além de inibirem o próprio processo (Rhee et al., 1997). A acumulação de nitritos pode acontecer devido à inibição da enzima nitrito redutase pelo oxigénio dissolvido ou pelo nitrato em excesso, pelas flutuações ambientais ou pela falta de carbono (Martienssen e Schops, 1997). Outros estudos demonstram que em alguns organismos desnitrificantes, a acumulação de nitrito é causada pela competição entre as enzimas nitrato redutase e nitrito redutase (van Rijn et al., 1996).

1.6.1. Fontes de carbono

Os microrganismos envolvidos na desnitrificação são heterotróficos e por isso obtêm o carbono para o crescimento celular a partir da matéria orgânica.

Nos sistemas de tratamento biológico, depois dos efluentes passarem pelos diferentes componentes do sistema, a concentração do carbono orgânico é em muitos casos insuficiente para que o processo de desnitrificação aconteça (Timmermans e Van Haute, 1983). Deste modo, tem de ser adicionada uma fonte de carbono externa (van Rijn et

al, 1996), pois a deficiência em carbono pode provocar uma acumulação de nitritos (Martienssen e Shops, 1997).

Os compostos mais usados pelas bactérias desnitrificantes são compostos orgânicos simples (metanol, etanol, acetato, ácidos orgânicos simples), substratos vegetais naturais (óleo vegetal, leite, margarina) ou de origem animal (gordura) (Wasik et al., 2001). A fonte de carbono empregue pode induzir diferenças significativas na eficiência da desnitrificação (van Rijn et al., 1996). A escolha de uma fonte de carbono externa obedece a vários requisitos: custos reduzidos, não deve ser tóxica ou perigosa em termos ambientais, e estimular uma desnitrificação completa (Lee e Welander, 1996). Segundo vários autores (Lee et al., 2000; Menasveta et al., 2001; Wasik et al., 2001; Gomez et al., 2002) o metanol é o dador de electrões mais adequado para os microorganismos que libertam azoto molecular a partir de nitrato ou nitrito. Consideram, ainda, que certas fontes de carbono (açúcares e acetato) podem resultar na produção e acumulação de ácidos orgânicos, que podem fazer baixar o pH. No entanto, vários açúcares (glucose, sacarose, lactose, frutose e galactose) são usados frequentemente em situações reais por causa do seu baixo custo e da sua presença nos efluentes industriais (Pinar et al., 1998; Gomez et al., 2002). Bilanovic et al. (1999) realizaram um estudo sobre o custo das fontes de carbono mais usadas no processo da desnitrificação. Os mesmos constataram que o metanol era a fonte com mais baixo custo. No entanto, este processo requer grandes quantidades de metanol por volume de água contaminada a tratar, o que torna a sua utilização dispendiosa.

1.6.2. Oxigénio dissolvido

A presença de oxigénio dissolvido afecta todos os passos da desnitrificação, embora de forma desigual (Jobbágy et al., 2000). Julgava-se que a desnitrificação era um processo estritamente anaeróbio, pois muitos investigadores descobriram que concentrações reduzidas de oxigénio podiam causar a completa cessação da actividade desnitrificante. Contudo, o efeito do oxigénio nos organismos desnitrificantes depende das estirpes microbianas consideradas. Por outro lado, como a desnitrificação produz menos energia do que a respiração aeróbia, o nitrato é preterido em favor do oxigénio (Gomez et al., 2002; Prescott et al., 2002; Gerhardt et al., 1994). Sabe-se também que o oxigénio dissolvido parece inibir a actividade da enzima nitrato redutase (Kornaros e Lyberatos, 1998). Os autores Jobbágy et al. (2000) demonstraram que, só quando se assegura

efectivamente a remoção de oxigénio do meio é que a desnitrificação é eficiente, e que quando a concentração de oxigénio dissolvido é baixa se observa uma diminuição considerável da taxa de desnitrificação. Segundo os mesmos autores, o impacto da penetração de oxigénio depende da quantidade de carbono presente. Isto é, se a quantidade de carbono for inferior à concentração de azoto, a inibição da desnitrificação, pela presença de oxigénio dissolvido, será maior.

1.6.3. Razão C/N

A razão óptima entre o carbono e o azoto (C/N) para bactérias desnitrificantes não apresenta um valor consensual na literatura consultada. Por exemplo, Wasik et al., (2001) concluíram que a razão óptima usando metanol, etanol ou ácido acético era, respectivamente, de 0,93, 1,05 e 1,32. No entanto, os mesmos autores observaram que a remoção completa do nitrato de um determinado efluente, usando um outro consórcio de bactérias desnitrificantes, só acontecia quando a razão C/N era de 2,14. Já Martienssen e Schops (1997) observaram que durante o tratamento de efluentes com metanol num bioreactor de lamas activadas acontecia uma grande acumulação de nitritos para uma razão C/N inferior a 1,5. Por outro lado, só menos de 0,1 % das bactérias isoladas eram capazes de reduzir o nitrito para uma razão C/N superior a 2,5. Num estudo realizado por Sauthier et al. (1998) com um efluente de pisciculturas de água salgada, verificou-se que uma razão C/N baixa, inferior a 0,5, conduzia a uma desnitrificação parcial, mas para uma razão elevada (superior a 1,5) havia uma diminuição do potencial de oxidação-redução e que, quando este parâmetro era negativo, ocorria uma acumulação de sulfitos devido à redução dos sulfatos presentes na água do mar. Ora, sabe-se que os sulfitos são ainda mais tóxicos que os nitritos para os peixes (Sauthier et al., 1998). O valor óptimo para a razão C/N determinado neste trabalho foi 1.0. Uma administração ponderada da fonte de carbono de modo a equilibrar a razão C/N, estabiliza o processo de desnitrificação evitando a instabilidade e a formação quer de nitritos, quer sulfitos, permitindo ainda uma redução eficiente do nitrato (Menasveta e at al., 2001).

1.6.4. Salinidade

Poucos estudos têm sido realizados sobre o efeito da salinidade na desnitrificação e, por isso, não existe grande consenso sobre este assunto (Glass e Silverstein, 1999). Os estudos já realizados indicam que a salinidade tem um efeito adverso na performance dum sistema típico de tratamento de efluentes. Panswad e Anan (1999) verificaram que, à medida que aumentava a salinidade, diminuía a taxa de desnitrificação. Os mesmos autores demonstraram que a eficiência na remoção de azoto pode ser melhorada num sistema biológico de tratamento de efluentes salinos se as culturas bacterianas usadas forem aclimatadas. Concluíram, ainda, que as bactérias desnitrificantes são capazes de se adaptarem a ambientes de grande salinidade. Por outro lado, Yang et al. (1995) ao estudarem um consórcio imobilizado observaram que o processo de desnitrificação diminuía para 75 % da sua eficácia a partir de 20 g/L de NaCl e que quando a concentração de NaCl aumentava para 30 g/L, a capacidade de desnitrificação diminuía para 60 % do seu valor máximo.

Em água do mar, conforme referido anteriormente, um dos problemas do processo de desnitrificação resulta da sua maior concentração de sulfatos. Em condições anaeróbias, o sulfato pode servir de aceitador de electrões e ser reduzido a sulfito, que é extremamente tóxico para os peixes. Contudo, se o potencial de oxidação-redução for elevado previne-se a redução do sulfato (van Rijn, 1996; Sauthier et al. 1998).

1.6.5. pH

Cada microrganismo tem um valor de pH óptimo, desenvolvendo-se numa gama de valores de pH que permitem o seu crescimento. A maioria das bactérias cresce melhor em condições de neutralidade, com um pH entre 6,5 e 7,5 (Ferreira e Sousa, 1998). O pH dos oceanos varia entre 7,5 e 8,5 e a maior parte dos microrganismos marinhos têm um crescimento óptimo, em meio de cultura, num intervalo de pH compreendido entre 7,2 e 7,6 (Pelczar, 1993).

Para valores de pH entre 7,0 e 8,0 não se verificam alterações significativas da taxa de desnitrificação (Dinçer e Kargi, 2000). Alguns autores demonstraram em testes efectuados em regime “batch” que um decréscimo do pH de 7,0 para 6,0 pode provocar uma diminuição da taxa de desnitrificação (Metcalf e Eddy, 2003).

1.6.6. Concentração de nitrato e nitrito

Sabe-se que a redução do nitrato é inibida pela presença de nitrito. Por outro lado, a redução do nitrito também pode ser inibida pela presença de nitrato (Martienssen e Schops, 1997). Alguns autores demonstraram que ocorria a acumulação de nitrito numa cultura de *Pseudomonas denitrificans* quando o nitrato estava presente. Com efeito, a adição de 30 mg /L de N-NO_3^- depois da redução do nitrito se ter iniciado, levou a uma diminuição de 61 % na taxa de redução do nitrito (Glass e Silverstein, 1998). Uma explicação para esta observação reside no facto de que a competição intracelular por electrões favorece a redução do nitrato e, por este motivo, a taxa de redução do nitrito é menor na presença do nitrato (Glass e Silverstein, 1998).

Vários investigadores têm referido que elevadas concentrações de nitrato ($> 3000 \text{ mg/L}$) inibem significativamente a desnitrificação. Esta inibição, acentuada drasticamente para valores de pH inferiores a 7, está associada à acumulação de nitrito (Glass e Silverstein, 1999).

Estes autores também verificaram que a tolerância a elevadas concentrações de nitrato é maior à medida que aumenta o pH.

1.6.7. Temperatura

A temperatura afecta profundamente a actividade de todos os organismos. As bactérias são particularmente susceptíveis a este factor, pois são unicelulares e a sua temperatura varia com a temperatura ambiente (Prescott et al., 2002).

A temperatura óptima para a actividade bacteriana varia entre 25 e 35 °C. As temperaturas abaixo do valor óptimo têm um efeito mais significativo na taxa de crescimento do que as temperaturas acima deste valor (Metcalf e Eddy, 2003).

A desnitrificação é influenciada pelas variações da temperatura como constatarem Park et al. (2001) que, ao realizarem estudos sobre este processo em água salina, observaram que à medida que a temperatura diminuía, a taxa de desnitrificação era menor. Com efeito, a utilização do nitrato pelas bactérias desnitrificantes depende da temperatura. A afinidade para o nitrato é reduzida pelas baixas temperaturas e ao mesmo tempo este é preterido pelo amónio (Reay et al., 1999).

1.7. Âmbito e objectivos do trabalho efectuado

Este trabalho pretendeu contribuir para um melhor conhecimento dos princípios e mecanismos fundamentais da desnitrificação em água salgada. O objectivo principal foi efectuar uma primeira avaliação da viabilidade de utilização de uma bactéria desnitrificante num sistema de tratamento biológico com desnitrificação para piscicultura marinha.

Deste modo procurou-se:

- Caracterizar em termos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares uma estirpe bacteriana isolada de uma piscicultura marinha.
- Avaliar a influência de diferentes factores na dinâmica de crescimento da bactéria (temperatura; salinidade; razão C/N; oxigénio dissolvido).
- Avaliar o crescimento da bactéria para algumas fontes de carbono frequentemente utilizadas em sistemas de tratamento biológico
- Descrever o processo de desnitrificação efectuado pela bactéria isolada, em regime “batch”, usando meios com diferente carga orgânica.
- Determinar a capacidade de adsorção da bactéria a diferentes substratos.
- Adaptar métodos e técnicas de cultura anóxica e de doseamento de nitratos em água salgada.

2. Material e métodos

O presente trabalho consistiu na caracterização de uma bactéria isolada de uma piscicultura marinha. Pretendeu-se também dar um contributo para o conhecimento do processo da desnitrificação biológica em água salgada.

Os estudos de Microbiologia foram realizados na Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto. A determinação analítica de nitratos e nitritos em amostras salinas de pequeno volume foi executada no Departamento de Zoologia e Antropologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e no CIIMAR (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental). Por último, a análise de ácidos gordos celulares e a sequenciação do gene 16S rRNA foi efectuada no Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto.

2.1. Isolamento do microrganismo desnitrificante

Sistemas porosos de argila expandida (leca – *light expanded clay aggregates*) foram colocados num biofiltro exterior de uma piscicultura marinha com o objectivo de aí se estabelecerem populações bacterianas típicas desses sistemas de tratamento. Passados alguns meses de colonização extraiu-se uma amostra do biofilme aderido aos suportes por vortexação com solução salina a 0,85 %. A suspensão resultante foi diluída em solução salina, plaqueada em nitrato agar de acordo com Rhee et al. (1997) e as placas foram colocadas numa jarra de anaerobiose. Das duas bactérias isoladas escolheu-se, para objecto de estudo deste trabalho, aquela que melhor cresceu em ensaios preliminares, sob condições anaeróbias em meio líquido preparado de modo idêntico ao anterior, mas com exclusão do agar. Esta bactéria foi designada por T2.

2.2. Identificação e Caracterização da bactéria isolada

2.2.1. Caracterização preliminar da bactéria T2

Para a bactéria T2 foi realizada uma caracterização morfológica, fisiológica e molecular. Todos os métodos descritos abaixo foram realizados com culturas jovens.

2.2.1.1. Teste de Gram

Foi feita uma observação directa ao microscópio óptico (ampliação: 1000x) de uma suspensão fresca da bactéria T2. Colocou-se uma pequena porção de uma colónia da bactéria em estudo numa lâmina para microscópio óptico, com uma gota de água. Depois de secar ao ar e fixar-se à chama adicionou-se o corante violeta. Um minuto depois lavou-se com água. Repetiu-se o procedimento com os reagentes indicados pela seguinte ordem: lugol, álcool concentrado, safranina. Por fim, observou-se ao microscópio óptico (ampliação 1000X) e de acordo com a cor do microrganismo determinou-se se o mesmo era Gram negativo (cor vermelha) ou Gram positivo (cor violeta).

2.2.1.2. Teste da Catalase

Com uma pipeta de Pasteur, colocou-se uma gota de água oxigenada (H_2O_2) numa caixa de petri à qual se adicionou uma colónia bacteriana. A imediata libertação de pequenas bolhas de gás indica a presença da enzima catalase (Gerhardt et al., 1994)

2.2.1.3. Teste da Oxidase

Foram colocadas algumas gotas de uma solução a 1 % de tetrametil-p-fenilenediamina num papel de filtro. Com uma ansa esterilizada impregnou-se uma porção da cultura no papel molhado. Um teste positivo consiste no desenvolvimento de uma cor violeta num espaço de 10-15 segundos, que indica a presença da enzima citocromo c oxidase (Gerhardt et al., 1994).

2.2.1.4. Teste API 20 NE (BioMérieux)

O teste API 20 NE é um sistema padronizado combinando oito testes convencionais e doze testes de assimilação, para identificação de bacilos Gram negativos não Enterobacteriaceae (ex: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc).

O teste API 20 NE comporta vinte microtubos contendo meios e/ou substratos desidratados. As galerias para os testes convencionais são inoculadas com uma suspensão bacteriana salina que reconstitui os meios e as bactérias crescem se conseguirem utilizar o substrato correspondente. Durante a incubação, o metabolismo bacteriano produz turbidez ou mudanças de cor espontânea ou revelada pela adição de reagentes.

As reacções são lidas de acordo com uma tabela, existente no manual do teste, e a identificação foi conseguida no presente trabalho usando o programa de software Apilab Plus (BioMérieux).

2.2.2. Testes complementares

Após se ter determinado que a bactéria T2 pertencia ao género *Pseudomonas*, analisaram-se algumas características que, segundo o Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey's (Krieg et al., 1984), são muito úteis na distinção de algumas das espécies pertencentes a este género.

2.2.2.1. Crescimento em Agar Específico para *Pseudomonas* (PAB)

Preparou-se meio PAB (*Pseudomonas* Agar Base, Oxoid) de acordo com as indicações do fabricante. Este é um meio selectivo para *Pseudomonas spp.*, e a formação de colónias azul-esverdeadas indica a presumível presença de colónias deste género (www.oxoid.com).

2.2.2.2. Teste de Fluorescência

Algumas estirpes de *Pseudomonas* produzem pigmentos para o meio que emitem fluorescência quando excitados por luz ultra-violeta (Gerhardt et al., 1994). Para verificar se a estirpe T2 produzia estes pigmentos (pioverdina) plaquearam-se as colónias em meio sólido King's B que foi preparado segundo a formulação do fabricante (Pronadisa, Barcelona). Após uma semana de crescimento observaram-se as placas à luz ultra-violeta.

2.2.2.3. Teste da Gelatinase

Este teste é utilizado para distinguir um conjunto de bactérias heterotróficas, entre as quais se incluem as *Pseudomonas* (Smibert e Krieg, 1981). Prepararam-se 3 tubos de ensaio com gelatina. Num dos tubos inoculou-se a bactéria T2 à superfície do gel. No segundo tubo, inoculou-se uma bactéria conhecida (controlo positivo) e no terceiro não se inoculou nenhuma estirpe (controlo negativo). Os tubos foram a incubar a 37 °C durante 48 horas. A seguir colocaram-se os tubos que apresentavam o meio liquefeito no frigorífico durante 30 minutos. Se a gelatina continuasse líquida ao fim deste tempo significava que a bactéria possuía a enzima gelatinase, que hidrolisava o gel.

2.2.2.4. Teste da Arginina Dihidrolase

Prepararam-se três tubos de ensaio com o meio de Moller's (contendo arginina, de acordo com Smibert e Krieg, 1981). O meio foi fervido, pois este teste realiza-se na ausência de oxigénio.

Num dos tubos de ensaio inoculou-se a bactéria em estudo inserindo uma ansa num movimento vertical no interior do meio e depois executou-se um movimento no sentido contrário. Utilizando o mesmo procedimento inoculou-se o segundo tubo com uma bactéria conhecida (controlo positivo) e o terceiro tubo não foi inoculado (controlo negativo). Para garantir a manutenção das condições de anaerobiose colocou-se uma camada de parafina à superfície dos tubos.

Uma reacção positiva consiste na mudança da cor do meio de amarelo para vermelho-violeta, passadas 48 horas. Esta reacção indica a presença da enzima arginina dihidrolase.

2.2.2.5. Crescimento a 41° C.

De acordo com Gerhardt et al. (1994), plaquearam-se colónias obtidas por crescimento em meio com peptona, com uma ansa esterilizada, em meio PAB e incubaram-se a 41 °C durante dois dias. Observaram-se as placas para verificar se havia formação de colónias.

2.2.2.5. Teste Hemolítico

Com uma ansa esterilizada, colónias da bactéria em estudo foram transferidas para placas de gelose de sangue (BioMerieux) esterilizadas. Incubaram-se as placas a 37 °C durante 24-48 horas. Se houver hemólise formar-se-á uma zona descorada em torno das colónias (Gerhardt et al., 1994).

2.2.3. Estudo preliminar da capacidade de desnitrificação

Num tubo de ensaio esterilizado colocou-se cerca de 5 ml inóculo bacteriano em meio com peptona. Utilizou-se um outro tubo de ensaio, mas sem inóculo, para servir de controlo. Em ambos os tubos de ensaio foi colocado um tubo de Durham invertido. O estudo realizou-se à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 3 dias. Após este período verificou-se se aconteceu (de acordo com Gerhardt et al., 1994):

- a) a redução do nitrato para amónio (se após a adição de reagente de Nessler ocorrer mudança de cor).
- b) a redução do nitrato para nitrito (se após adição de ácido sulfâmico ocorrer mudança de cor para vermelho).
- c) a ausência de redução do nitrato (se após a adição de uma pitada de zinco em pó acontecer a mudança de cor para vermelho).
- d) a redução do nitrato a azoto molecular (se ocorrer a formação de bolhas de gás nos tubos de Durham).

2.2.4. Análise dos Ácidos Gordos Celulares

Preparou-se cerca de 750 ml de cultura pura da bactéria T2 em meio com peptona e centrifugou-se a mesma em fase exponencial. Lavou-se a cultura em solução salina 0,85 % uma vez e voltou-se a centrifugar. Liofilizou-se a biomassa formada e pesou-se cerca de 0,5 g.

A análise dos ácidos gordos foi realizada pela Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Alemanha (www.dsmz.de), por cromatografia gasosa.

2.2.5. Métodos Moleculares de Identificação - amplificação por PCR e sequenciação do gene 16S rRNA

Para obter DNA para a posterior sequenciação do gene 16S rRNA escolheu-se uma placa com 200 a 300 colónias puras da bactéria T2 crescida em meio com peptona. Com uma vareta de vidro esterilizada raspavam-se e diluíram-se as colónias em 1 ml de solução salina (0,85 %). A suspensão resultante foi transferida para um eurotubo esterilizado e voltou-se a repetir o mesmo procedimento. A suspensão resultante foi centrifugada a 5000 r.p.m. durante 10 minutos, a 4 °C, numa centrífuga Hettich Rotina 35 R. Após esta operação decantou-se o sobrenadante e congelou-se o pellet resultante a uma temperatura de – 80 °C.

O molde de DNA foi obtido levando à fervura por 5 minutos com 50 µl de água destilada uma suspensão de células usando-se posteriormente 2µl de sobrenadante. O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR usando os primers f27-r1492 (Lane, 1991) sob condições de PCR normalizadas (30 ciclos com “annealing” a 55° C) com Taq DNA polimerase (MBI Fermentas, Lithuania). Os fragmentos amplificados foram clonados usando o sistema pGEM T-Easy vector (Promega) e sequenciados por STAB Genomica, Lisboa, Portugal (Taq DyeDeoxy Terminator Sequencing e o Modelo 373A gel apparatus, Applied Biosystems) usando primers universais para o vector e o primer 16S-específico f357 (Lane, 1991). As sequências do gene 16S rRNA foram alinhadas usando o programa BioEdit (versão 4.8.8) (Hall, 1999) e foram analisadas usando os programas DNAML, SEQBOOT (100 iterações), DNADIST (Kimura 2-parâmetros), NEIGHBOR e CONSENSE do pacote PHYLIP (Felsenstein, 1995). As sequências de

16S rRNA usadas para comparação com a sequência desconhecida foram obtidas a partir da base de dados de informação taxonómica do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>). Foi realizado o alinhamento de 20 sequências com 1345 sequências de nucleótidos.

2.3. Manuseamento das culturas

2.3.1. Teste de pureza

Todos os ensaios efectuados neste trabalho foram realizados usando culturas puras. Para se verificar o estado de pureza das culturas usadas realizaram-se diluições decimais destas com solução salina esterilizada (0,85 %). Espalharam-se 100 µl de cada uma das diluições em placas de Marine agar esterilizado (Difco 2216) (dois replicados por diluição). Observou-se a morfologia das colónias formadas nas placas de modo a detectar alguma colónia com aspecto diferente do que era esperado.

2.3.2. Congelamento de culturas

De modo a poder dispor-se sempre de inóculo puro da estirpe T2, uma vez verificado o estado de pureza das pré culturas procedeu-se à sua congelação em tubos de congelação. Cada tubo foi esterilizado com 200µl de uma solução de glicerol a 87 %, adicionando-se depois 1 ml de cultura em final de fase exponencial.

Os tubos foram congelados a uma temperatura de -80 °C.

2.3.3. Recuperação de culturas

As células conservadas a uma temperatura de -80 °C foram descongeladas à temperatura ambiente. Após o descongelamento, iniciou-se o processo de recuperação inoculando 1ml da suspensão bacteriana em 9 ml de meio com peptona. A incubação efectuou-se em frascos de 50 ml, fechados com tampas de borracha e tampas de alumínio, previamente esterilizados. Esta transferência ocorreu pelo menos mais duas vezes, para o meio onde se iam realizar os ensaios.

As células a usar posteriormente como inóculo foram recolhidas em fase exponencial e foram lavadas 2 vezes com solução salina a 0,85 % e só depois ressuspensas no meio de cultura a usar. O volume de inóculo utilizado foi cerca 10 % do volume total de

cultura, correspondendo a uma densidade óptica entre 0,6 e 0,7 no início das experiências. O inóculo bacteriano foi preparado em condições aeróbias ou anaeróbias de acordo com as condições dos ensaios a realizar à excepção do ensaio em anaerobiose com meio mínimo, descrito em 2.5.

2.3.4. Meios de cultura utilizados

Os meios utilizados nos diferentes ensaios realizados com a bactéria T2 foram os seguintes:

- Meio com peptona, MP (de acordo com Rhee et al., 1997)

Peptona.....	5 g
Extracto de carne	3 g
KNO ₃	1 g (10 mmoles/L de N-NO ₃ ⁻)
NaCl	28 g
Água destilada.....	1L

- Meio mínimo, MM (de acordo com Bastos et al., 2002)

Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	2,67 g
KH ₂ PO ₄	1,40 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
KNO ₃	1,0 ou 0,3 g (10 ou 4 mmoles/L de N-NO ₃ ⁻), de acordo com Rhee et al. (1997) e van Rijn et al. (1996)
NaCl	28 g
Solução de elementos traço	10 ml
Água destilada.....	1L

- Solução de elementos traço (de acordo com Bastos et al., 2002)

Na OH	2,0 g
(Na) ₂ EDTA.2H ₂ O ...	12,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 g
CaCl ₂	1,0 g
Na ₂ SO ₄	10,0 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,4 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,4 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,1 g
H ₂ SO ₄ conc.	0,5 ml
Água destilada.....	1L

Esta solução foi esterilizada separadamente do restante meio. Nos ensaios com condições anaeróbias a mesma foi esterilizada com um filtro de 0,20 µm e só foi adicionada ao meio de cultura no início de cada experiência.

- Fontes de carbono

- Extracto de levedura (Lab M) – 3 a 6 g/L (7,5 a 15 mmols/L)

O extracto de levedura foi sempre utilizado como fonte de carbono nos ensaios com meio mínimo. Este produto prepara-se através da autólise de células de *Saccharomyces*. É constituído essencialmente por aminoácidos, péptidos, vitaminas e carboidratos.

- Metanol (Merck), acetato de sódio (Merck), glucose (Merck) - 7,5 a 15 mmols/L

2.3.5. Metodologia usada para obtenção de condições aeróbias

Neste caso o meio de cultura usado foi distribuído pelos frascos de ensaio de modo a deixar um espaço livre com ar de cerca de 60 % do volume total do recipiente (50 ou 100ml). Depois de fechados com tampas de borracha e tampas de alumínio, os frascos foram a autoclavar.

2.3.6. Metodologia usada para obter condições anaeróbias

A metodologia seguida foi desenvolvida de acordo com Gerhardt et al. (1994) e adaptada depois de realizados alguns testes preliminares.

Ao meio de cultura utilizado foi adicionado um indicador, a resazurina (10 ml de indicador/ litro de meio), que em presença de oxigénio apresenta uma cor rosa mais ou menos intensa.

Este meio de cultura foi fervido durante 5-10 minutos e distribuído pelos frascos de ensaio, de modo a ocupar cerca de 80 % do volume total dos mesmos. Para remover o excesso de oxigénio presente utilizou-se um gás, o azoto, que ficou a borbulhar no meio durante cerca de 12-15 minutos (para um volume de meio de 50 ml). Para remover o oxigénio do espaço livre com ar também se fez passar o feixe de azoto, enquanto a tampa de borracha cobria parte do bucal do frasco. Depois de fechados com tampas de borracha e tampas de alumínio, os frascos de 50 a 100 ml foram a autoclavar.

Após a esterilização do meio, adicionou-se uma solução de cisteína esterilizada (10 ml de cisteína/ litro de meio) para fazer baixar o potencial redox. De modo a acelerar este processo os frascos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para o meio perder totalmente a cor rosa da resazurina.

2.3.7. Avaliação do crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano foi avaliado através da leitura da densidade óptica de amostras retiradas da cultura a tempos determinados.

A leitura da densidade óptica foi efectuada num espectrofotómetro Unicam – Hélios Gamma, num comprimento de onda de 600 nm contra um branco de água destilada. Em algumas situações, quando o meio continha resazurina, o branco era constituído pelo

meio esterilizado juntamente com este corante. É ainda de referir que, nas situações em que a densidade óptica era superior a 1.0 unidades de absorvância se realizaram diluições para adequar a medição à gama linear de absorvância ($0 \text{ a } \pm 1.0$ unidades de absorvância).

Uma medida equivalente da concentração de biomassa foi determinada efectuando uma correlação entre as leituras da densidade óptica e o peso seco celular.

Para se fazer a conversão da densidade óptica em peso seco celular (g/L) preparou-se uma cultura com uma densidade óptica superior a 0,7, a partir da qual se realizaram diluições decimais. As mesmas foram filtradas através de filtros (supor® 47mm) de 0,2 μm , que foram previamente secos numa estufa a 105 °C durante 24 horas. Os filtros foram arrefecidos num excicador e pesados numa balança analítica Sartorius. Os filtros foram lavados com 150 ml de água destilada após cada filtração. Para soluções mais densas utilizou-se uma menor quantidade de amostra e a lavagem do filtro com água destilada foi realizada na mesma proporção. Esta operação foi realizada em triplicado.

Os filtros foram novamente secos, arrefecidos e pesados como foi referido acima. O peso seco celular foi calculado subtraindo o peso do filtro ao peso do filtro com a cultura. A partir dos valores de peso seco obtidos em todas as diluições conhecidas, elaborou-se uma recta de regressão, que permite determinar a biomassa da cultura, em gramas por litro, a partir da densidade óptica (Anexo 1).

2.4. Ensaio de crescimento efectuados

2.4.1. Avaliação da influência da salinidade em condições aeróbias

Para se analisar a influência da salinidade no crescimento da bactéria T2 prepararam-se duas séries experimentais: (1) meio com peptona e 2,8 % de NaCl; (2) meio com peptona e sem NaCl. Ambos os grupos foram a incubar a duas temperaturas diferentes: (1) temperatura ambiente (± 25 °C); (2) temperatura controlada (30 °C).

O ensaio foi realizado em duplicado, em condições aeróbias, com luz natural e sem agitação.

2.4.2. Avaliação do crescimento em meio com peptona e meio mínimo suplementado, em anaerobiose

O trabalho desenvolvido até esta fase tinha sido sempre realizado em meio com peptona e aerobiose. Este ensaio teve como objectivo comparar o crescimento da bactéria usando o meio referido (MP) e meio mínimo (MM) com 3 g de extracto de levedura, ambos com 1 g de KNO_3 e 28 g de NaCl por litro de água destilada.

O ensaio foi realizado em duplicado, em condições anaeróbias, à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), com luz natural e sem agitação. Realizou-se também um ensaio em meio com peptona, em anaerobiose, mas sem nitratos, que funcionou como controlo.

2.4.3. Avaliação do crescimento em condições anaeróbias, com diferentes fontes de carbono e razões C/N

Após se ter verificado que a estirpe T2 crescia em condições anaeróbias com meio mínimo contendo extracto de levedura, realizou-se um ensaio de modo a avaliar o comportamento da bactéria para outras fontes de carbono (glucose, acetato e metanol).

Preparou-se meio mínimo com 0,3 g de KNO_3 (de acordo com van Rijn et al., 1996) e 28 g de NaCl por litro de água destilada. A quantidade de KNO_3 usada foi inferior à quantidade usada nos estudos anteriores (1 g KNO_3/L), de modo a adequar a concentração de nitrato aos valores encontrados nas pisciculturas e na literatura consultada. A fonte de carbono a estudar foi adicionada ao meio de cultura a partir de soluções concentradas de extracto de levedura (10 %), glucose (2 %), acetato de sódio (2 %) e metanol (1 %), previamente esterilizadas. Estas soluções foram adicionadas de modo a obter uma razão C/N (glucose, acetato de sódio e metanol) de 1.0 num primeiro ensaio e posteriormente de 2.0. Para o extracto de levedura partiu-se do pressuposto de que existia 50 % de carbono na sua composição.

A incubação realizou-se em duas séries experimentais: uma em condições aeróbias, outra em condições anaeróbias. Ambas se encontravam a uma temperatura de 25°C , com luz natural e com agitação (50 r.p.m.). Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

2.5. Caracterização do processo de desnitrificação

A desnitrificação foi avaliada em condições anaeróbias usando dois meios diferentes: (1) meio com peptona com 1g/L de KNO_3 ; (2) meio mínimo com 0,3g de KNO_3 , ambos com 2,8 % de salinidade.

Distribuiu-se cerca de 80 ml de meio por frascos de 100 ml que foram fechados com tampas de borracha e alumínio e posteriormente autoclavados. Os ensaios do MP foram realizados em duplicado e os do MM em triplicado.

No meio mínimo, o carbono foi adicionado a partir de uma solução concentrada de extracto de levedura (10 %), previamente esterilizada. Esta solução foi adicionada de modo a obter uma razão $\text{C/N} = 1.0$. O inóculo utilizado nos ensaios com meio mínimo foi transferido várias vezes neste meio.

O ensaio com meio com peptona realizou-se à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), enquanto que para o ensaio com o meio mínimo foram testadas duas temperaturas: temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) e temperatura controlada (30°C), em ambos os casos com agitação. O estudo efectuado com meio com peptona foi realizado em 3 séries independentes (e duplicados para cada série). O estudo realizado com meio mínimo foi realizado numa única série experimental e em triplicado.

2.6. Estudo da adsorção a diferentes matrizes

O estudo de adsorção realizou-se em aerobiose com três matrizes diferentes: carvão activado granular, leca e anéis de acrílico. Preparou-se uma cultura bacteriana que cresceu em meio com peptona até atingir uma densidade óptica superior a 0,9. Posteriormente, centrifugou-se a cultura a 5000 r.p.m numa ultra-centrifugadora (Sorvall - Modelo RC5C) durante 15 minutos e lavou-se a mesma com solução salina a 0,85 %. A seguir, ressuspendeu-se a cultura em meio mínimo sem carbono.

Os frascos experimentais foram previamente esterilizados juntamente com 1g de uma das matrizes e fechados com uma tampa de borracha e outra de alumínio. Posteriormente, cada frasco foi inoculado com 25 ml de cultura e colocado numa incubadora orbital (ABALAB - Agitorb 200 IC) com uma agitação de 50 r.p.m., à temperatura ambiente.

O estudo foi realizado em duplicado e juntamente com um controlo positivo, que não continha nenhuma matriz e um controlo negativo onde não se utilizou inóculo.

A adsorção foi avaliada através da quantificação das bactérias presentes no sobrenadante, após um certo período de tempo. Para tal, realizaram-se leituras da densidade óptica do sobrenadante e determinou-se o número de bactérias presentes mediante contagens do número de colónias desenvolvidas em placas de Marine Agar (U.F.C. / ml do sobrenadante).

No final da experiência quantificou-se também o número de bactérias aderidas às matrizes. Para isso, realizou-se a extracção das bactérias de acordo com o procedimento descrito em 2.1. e fez-se o plaqueamento em Marine Agar. A contagem do número de colónias formadas permitiu calcular o grau de adesão em U.F.C./ g de matriz.

2.7. Técnicas analíticas usadas e suas adaptações

Existem vários métodos para determinar a concentração de nitrato na água, como, por exemplo, a espectrofotometria de ultra-violetas, eléctrodos selectivos, coluna de redução Cd-Hg, coluna de redução Cd-Cu e outros. Contudo, alguns autores concluíram que estes métodos não eram muito precisos, principalmente para baixas concentrações de nitrato (Jones, 1984) e que geralmente necessitavam de um volume de amostra considerável (50 ml).

Para a realização do presente estudo era necessário um método mais preciso e que permitisse processar simultaneamente um grande conjunto de amostras e padrões (exemplo: 30 a 50 tubos) de pequeno volume (5ml). Por estas razões, foi decidida a utilização de um método desenvolvido por Jones (1984) para a determinação precisa de nitratos em águas de estuário e água intersticial de sedimentos de estuarinos.

Este método consiste em tamponar as amostras a um pH de 8,5 e agitá-las durante 90 minutos com cádmio esponjoso, obtido usando barras de zinco colocadas numa solução de CdSO_4 a 20 %. Com este método, o nitrato é reduzido a nitrito, o qual é depois analisado por uma técnica colorimétrica de rotina. Com o cádmio esponjoso evitam-se problemas com a progressiva deterioração na capacidade de redução das colunas de cádmio, permitindo, ainda, uma redução mais eficiente e homogénea. Outra das vantagens é que este método consegue reduzir mais de 99 % do nitrato em concentrações de NaCl correspondentes à água do mar. No entanto, a metodologia geral descrita por Jones (1984) teve que ser adaptada à situação específica deste estudo, pelas seguintes razões: (1) o autor referido utilizava amostras de 50 ml e neste estudo as amostras a dosear não eram superiores a 5 ml; (2) a maior parte das amostras

apresentavam concentrações de nitrato superiores ao limite da técnica, o que implicou a necessidade de grandes diluições, com uma possibilidade de perda de precisão do método; (3) algumas amostras analisadas continham um corante, a resazurina (indicador redox), que apresenta uma cor rosa, e que podia interferir com a reacção colorimétrica; (4) um dos meios de cultura ensaiados continha uma grande quantidade de matéria orgânica, a qual também podia interferir com a determinação analítica. Por este motivo, realizaram-se alguns testes preliminares para testar e melhorar a aplicação desta técnica.

2.7.1. Avaliação de possíveis interferências com as técnicas usadas

- Para avaliar se existiam diferenças significativas para as diluições utilizadas neste trabalho, realizaram-se diluições da mesma amostra da ordem de 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 (nitritos) e 1:500, 1:750 e 1:1000 (nitratos) e efectuou-se uma análise de variância (ANOVA) unifactorial para as concentrações finais obtidas. Ao mesmo tempo realizou-se uma outra análise à precisão do método verificando se havia diferenças significativas entre os triplicados efectuados. As elevadas diluições utilizadas permitiram também eliminar a interferência, devido ao sal, nas análises de nitrato (Tal et al., 2003).
- Devido à presença de resazurina em algumas amostras analisou-se a sua influência nas leituras de absorvância a efectuar. Para tal, realizaram-se várias diluições das amostras (1:5; 1:10; 1:50; 1:100) e comparou-se a absorvância destas contra um branco de água destilada.
- Por outro lado, o meio de cultura com peptona tem uma composição complexa e para verificar se este meio interferia negativamente no processo de redução do nitrato, adicionou-se uma quantidade de KNO_3 conhecida a amostras do meio e a amostras retiradas dos ensaios sobre desnitrificação. Compararam-se posteriormente os resultados obtidos com e sem dopagem.

2.7.2. Determinação de nitratos

As amostras foram centrifugadas a 10000 r.p.m durante 10 minutos de modo a eliminar as bactérias presentes (Bilanovic et al, 1999) e foram congeladas a -20 °C (Aminot e Chaussepied, 1983). As mesmas foram descongeladas à temperatura ambiente para o doseamento de nitratos e nitritos.

Colocou-se 1 ml de solução de cloreto de amónio e uma porção de cádmio esponjoso (0,35 a 0,45 g) em tubos de plástico com um volume de 15 ml. Em cada um destes tubos foram colocados 5 ml de amostra (diluída em diferentes proporções) que foi a incubar em agitação constante (Stuart Scientific – Plataforma STR8), a 100 oscilações por minuto, na horizontal, durante 90 minutos. Depois desta operação retirou-se 5 ml da amostra para outro tubo e adicionou-se 250 µl de reagente colorido para doseamento dos nitritos. Cerca de 10 minutos depois leu-se a absorvância a 540 nm a temperatura ambiente (Jones, 1984).

Para todas as análises efectuadas procedeu-se à elaboração de rectas padrão. Para isso, preparou-se um branco e um conjunto de soluções com concentração conhecida de N-NO₃⁻ (0, 10, 20 e 40 µmoles/L). O ensaio em branco e as soluções padrão foram tratados do mesmo modo que as amostras (Anexo 2).

A concentração de nitratos em cada amostra foi determinada a partir da seguinte equação:

$$N-NO_3^- = ((D \times A \times C) - N-NO_2^-) \times F \text{ em que,}$$

N-NO₃⁻ - concentração de nitratos dissolvidos na amostra (µmoles/L),

D – declive da recta padrão,

A – valor de absorvância obtido para a amostra,

C – 1,2 (factor de diluição do reagente cloreto de amónia),

N-NO₂⁻ – concentração de nitritos presente inicialmente na amostra,

F – factor de diluição das amostras

2.7.3. Determinação de nitritos

A concentração de nitritos foi determinada a partir do método colorimétrico da sulfalinamida, de acordo com a metodologia descrita em Aminot e Chaussepied (1983). Para todas as análises efectuadas procedeu-se à elaboração de rectas padrão (Anexo 2). Para isso, preparou-se um branco e um conjunto de soluções com concentração conhecida de N-NO_2^- (0; 0,5; 1; 2; 5 e 10 $\mu\text{moles/}$).

A concentração de nitratos em cada amostra foi determinada a partir da seguinte equação:

$$\text{N-NO}_2^- = (D \times A) \times F$$

N-NO_2^- - concentração de nitritos dissolvidos na amostra ($\mu\text{moles/L}$),

D – declive da recta padrão,

A – valor de absorvância obtido para a amostra.

F - factor de diluição das amostras

2.8. Tratamento estatístico

Os dados foram analisados para um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) usando o teste t-student para determinar se havia diferenças significativas entre as médias dos ensaios realizados em duplicado. Para avaliar se a diferença entre as médias de vários grupos simples era significativa utilizou-se uma análise de variância (ANOVA) unifactorial e o teste de Newman-Keuls para comparações *à posteriori*. A análise de regressão linear foi usada para avaliar as taxas de crescimento e de desnitrificação e para a elaboração de rectas-padrão. Estes testes foram realizados usando a versão do Excel XP (Microsoft) e o programa Statistica 6.0 para Windows.

Resultados

3.1. Identificação e caracterização da bactéria estudada

A caracterização da bactéria T2 baseou-se nos parâmetros características fenotípicas, ácidos gordos e sequenciação do gene 16S rRNA.

3.1.1. Características fenotípicas

As colónias da bactéria T2 são circulares e amareladas com um ponto amarelo escuro no centro (figura 1).

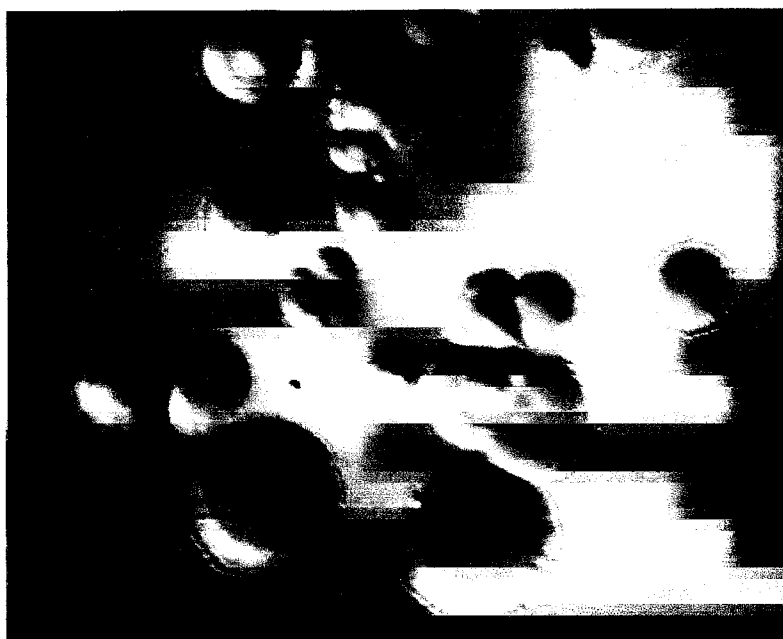


Figura 1. Morfologia macroscópica das colónias da bactéria T2

As características bioquímicas da bactéria T2 estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características bioquímicas da bactéria T2

Teste	Bactéria T2
Gram	Negativo
Teste da Catalase	Positiva
Teste da Oxidase	Positiva
API 20NE	
Produção de triptofano	Negativa
Acidificação da glucose	Negativa
Arginina dihidrolase	Positiva
Urease	Negativa
Hidrólise da esculina	Positiva
Hidrólise da gelatina	Positiva
B-Galactosidase	Negativa
D-Glucose	Positiva
L-Arabinose	Negativa
D-Mannose	Positiva
D-Manitol	Negativa
N-Acetil-D-glucosamina	Positiva
Maltose	Negativa
Gluconato	Positiva
Caprato	Positiva
Adipato	Negativa
L-Malato	Positiva
Citrato	Positiva
Fenilacetato	Negativa

Os resultados do teste API 20 NE indicaram que a bactéria T2 pertenceria à espécie *Pseudomonas fluorescens* ou à espécie *Pseudomonas aeruginosa* com 57,2 % e 40,1 % de probabilidade, respectivamente.

3.1.2. Testes complementares de caracterização

Os testes da arginina dihidrolase e da gelatinase foram positivos, conforme já se tinha observado pelo teste API. A bactéria T2 possui também a enzima arginina dihidrolase e produziu pigmentos difusíveis amarelo fluorescentes no meio King's B, mas não produziu a enzima pneumolisina que degrada os glóbulos vermelhos do sangue de ovelha em condições aeróbias. A bactéria não cresceu a uma temperatura de 41 °C e cresceu num meio PAB formando colónias azuis esverdeadas. Todos estes resultados apontam para que a bactéria T2 pertença ao grupo das bactérias fluorescentes do género *Pseudomonas* e mais especificamente à linhagem *Pseudomonas fluorescens*.

3.1.3. Estudo preliminar da capacidade de desnitrificação

O conjunto de testes efectuados permitiu saber o tipo de comportamento que a bactéria T2 exhibia face ao nitrato existente no início do ensaio. Assim, para detectar a presença de nitritos, resultantes de uma possível redução do nitrato, adicionou-se uma gota de ácido sulfâmico aos dois tubos (T2 e controlo). Como não houve mudança de cor em nenhum deles concluiu-se que os nitritos não estariam presentes no meio.

Após este teste verificou-se se o nitrato original não tinha sido alterado durante o procedimento experimental, adicionando uma pequena quantidade de zinco. A reacção foi negativa no tubo com a bactéria T2 (o meio não mudou de cor), mas no controlo a cor do meio mudou para vermelho. Esta cor indica a presença de nitritos. Contudo, neste caso, o nitrato existente no meio foi reduzido pelo zinco e não pela bactéria, conforme descrito acima.

Um outro teste foi realizado para verificar se teria acontecido redução do nitrato a amónio. Adicionou-se ao meio umas gotas de reagente de Nessler e a reacção foi negativa, pois o meio não adquiriu uma cor amarelada ou alaranjada.

Observou-se que no interior dos tubos de Durham se formaram pequenas bolhas de ar, o que indica presumivelmente a formação de N_2 .

Não se tendo observado, no fim da incubação, nem a produção de amónio, nem a presença de nitrato e nitrito, mas sim a formação de gás, pode pensar-se que a bactéria T2 é capaz de desnitrificar completamente o nitrato presente no meio.

3.1.4. Análise dos Ácidos Gordos Celulares

Os principais ácidos gordos extraídos da bactéria T2 são os ácidos gordos insaturados 18:1 ω -7c, 16:0, 16:1 ω -7c, 16:1 ω -6c, 17:0 ciclo propano. Os ácidos gordos 2- e 3-hidróxidos, com uma cadeia de 10:0 e 12:0 átomos de carbono de comprimento foram encontrados em menor quantidade. A presença destes últimos permite diagnosticar as espécies do género *Pseudomonas* e organismos próximos, a que a bactéria T2 pertencerá.

3.1.5. Sequenciação do gene 16S rRNA e análise filogenética

Realizou-se a amplificação e sequenciação quase completa do DNA genómico do gene 16S rRNA da bactéria T2 e através de uma pesquisa feita pelo programa Basic Local Alignment Search Tool, (BLAST, NCBI) verificou-se que a sequência da estirpe T2 era muito semelhante à das estirpes de outras bactérias fluorescentes pertencentes ao género *Pseudomonas*, existente na base de dados GenBank (NCBI). A análise filogenética efectuada demonstrou que a bactéria T2 apresenta uma similaridade da ordem dos 98-99 % com as espécies, *P. gessardi*, *P. libanensis*, *P. synxantha*, *P. reactans*, e *P. fluorescens* (figura 2). No Anexo 3 podem observar-se a sequência obtida para a bactéria T2 e as sequências conhecidas do gene 16S rRNA para as espécies de *Pseudomonas* mais próximas da bactéria T2.

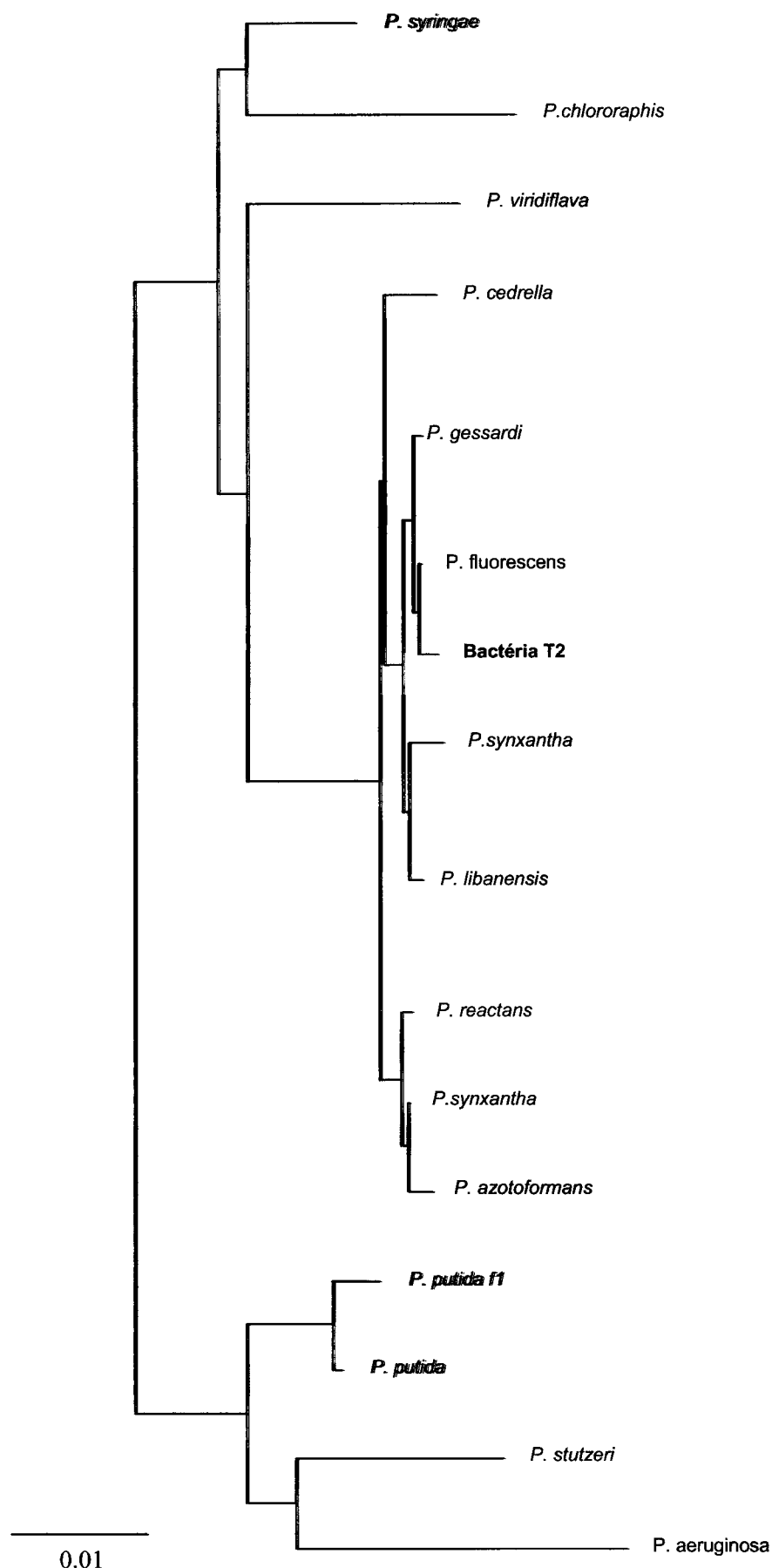


Figura 2. Relações filogenéticas baseadas nas sequências do gene 16S rRNA entre organismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e a estirpe T2. Barra = 0.1 Knuc (taxa de substituição nucleotídica). *E.coli* foi usada como "outgroup" para a árvore filogenética.

3.2. Ensaio de crescimento

3.2.1. Avaliação da influência da salinidade em aerobiose

Os resultados dos ensaios em meio com peptona para investigar a influência da salinidade no crescimento da estirpe T2, a uma temperatura de 25 °C, apresentam-se na Figura 3. No meio com 2,8 % de NaCl a taxa de crescimento foi de 0,12 h⁻¹ e a biomassa máxima formada foi 421 mg/L. Na ausência de NaCl a taxa de crescimento foi superior, 0,17 h⁻¹ e a biomassa máxima foi de 392 mg/L. As diferenças entre o crescimento (biomassa) observado com ou sem a presença de NaCl não são significativas (t-student, p>0,05).

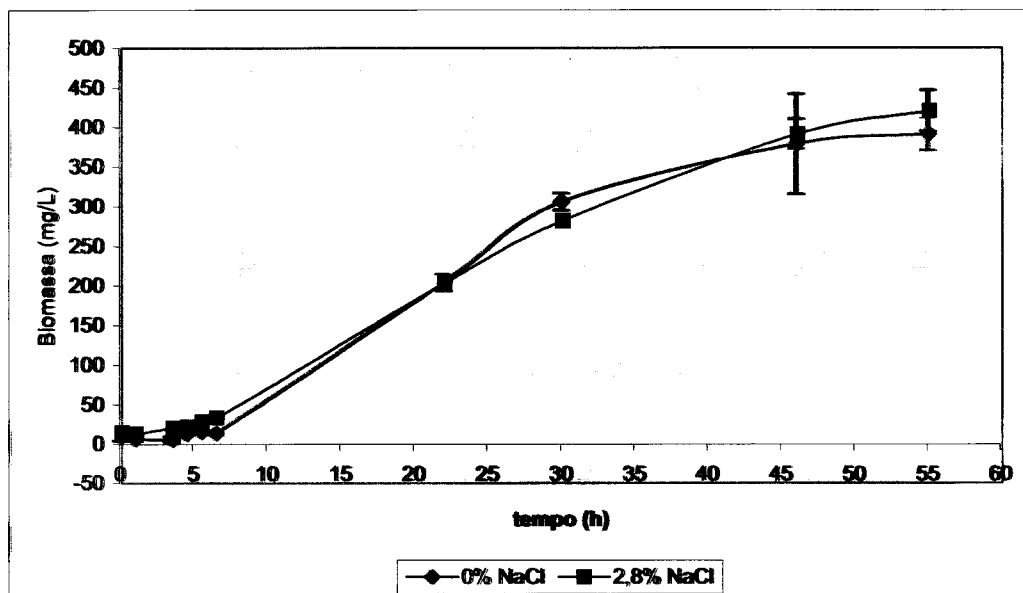


Figura 3. Crescimento observado com e sem NaCl a uma temperatura de 25 °C, em meio com peptona e em aerobiose.

No ensaio realizado a uma temperatura controlada de 30 °C (figura 4), a taxa de crescimento em presença de NaCl ($0,28 \text{ h}^{-1}$) foi ligeiramente superior à taxa de crescimento sem NaCl ($0,22 \text{ h}^{-1}$). A biomassa máxima obtida nas duas situações ensaiadas (276 e 423 mg / L) é significativamente diferente (t-student, $p < 0,05$).

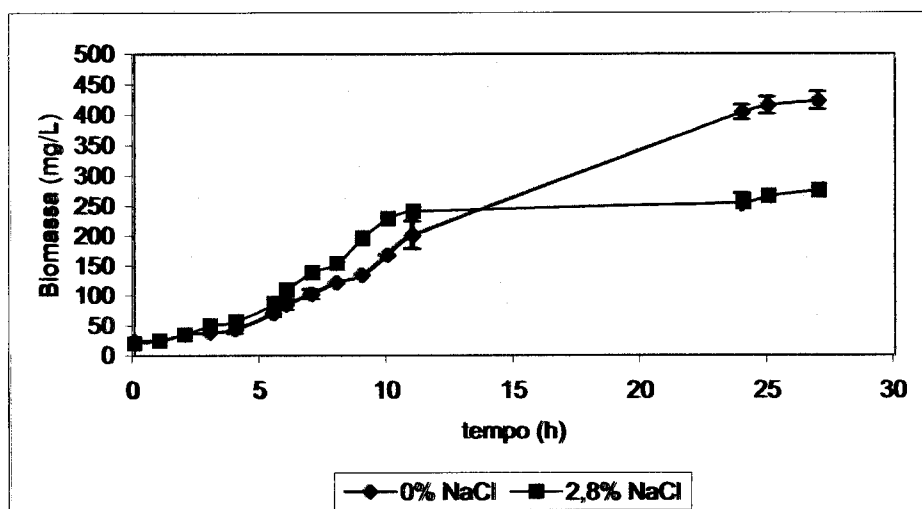


Figura 4. Crescimento observado com e sem NaCl a uma temperatura de 30 °C, em meio com peptona e em aerobiose.

No ensaio realizado a 30 °C o valor médio das taxas de crescimento obtidas com e sem NaCl, foi $0,25 \text{ h}^{-1}$, o que é um valor superior ao do ensaio realizado a uma temperatura de 25 °C ($0,15 \text{ h}^{-1}$). Este facto está bem patente nas figuras 3 e 4, pois a biomassa máxima é atingida em cerca de 25 horas sob temperatura de 30 °C e em cerca de 50 horas para a temperatura ambiente (25 °C), e isto independentemente da presença ou ausência de sal no meio. Contudo, verificou-se ainda que, para uma temperatura mais elevada, no meio com NaCl a partir das 12 horas deixa de haver crescimento, enquanto na ausência de NaCl a bactéria continua a crescer, levando a uma produção de biomassa final muito superior neste caso.

A diferença entre os valores de biomassa máxima para os ensaios realizadas sem NaCl, para as duas temperaturas, não é significativa (t-student, $p > 0,05$). No entanto, nos ensaios realizados com NaCl, a uma temperatura mais elevada, ocorre uma diminuição de biomassa final da ordem dos 35 %.

3.2.2. Avaliação do crescimento em meio com peptona e meio mínimo, em anaerobiose

Com este ensaio pretendeu-se comparar o crescimento da estirpe T2 em dois meios com cargas orgânicas diferentes, ambos em condições anaeróbias, com 1g/L de KNO_3 e com 2,8 % de NaCl: (1) meio com peptona; (2) meio mínimo.

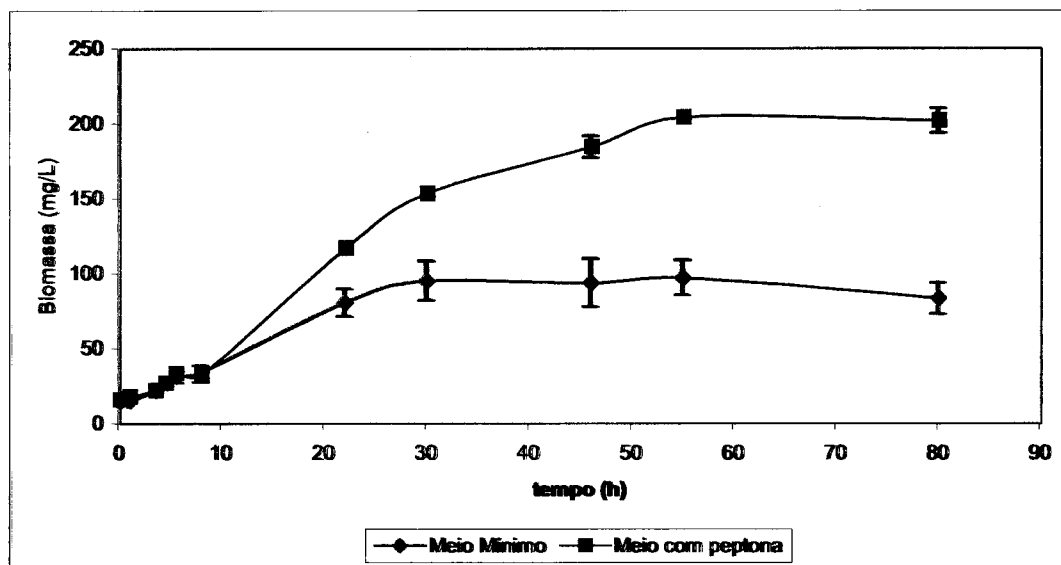


Figura 5. Crescimento observado em meio com peptona e meio mínimo (com extracto de levedura) ambos com 1g KNO_3 /L, a 2,8 % de NaCl, a uma temperatura de 25 °C, em anaerobiose

Os ensaios realizados em meio com peptona e em meio mínimo apresentaram taxas de crescimento de $0,08 \text{ h}^{-1}$ e $0,06 \text{ h}^{-1}$ respectivamente. No que diz respeito à biomassa máxima formada, a diferença entre os dois grupos é significativa (t-student, $p < 0,05$) (figura 5). No meio com peptona, o crescimento parou a partir das 50 horas, enquanto que, no meio mínimo deixou de haver crescimento depois das 30 horas.

Comparando os resultados obtidos em meio com peptona na presença e na ausência de oxigénio (figuras 3 e 5, respectivamente), verifica-se que:

(1) a taxa de crescimento é superior em condições aeróbias; (2) a diferença entre a biomassa máxima formada com/sem oxigénio é significativa (t-student, $p < 0,05$); (3) em condições aeróbias forma-se o dobro da biomassa.

Efectuou-se um ensaio com peptona, 2,8 % de NaCl e em condições anaeróbias, mas sem KNO_3 (figura 6), não se tendo observado crescimento bacteriano nestas condições.

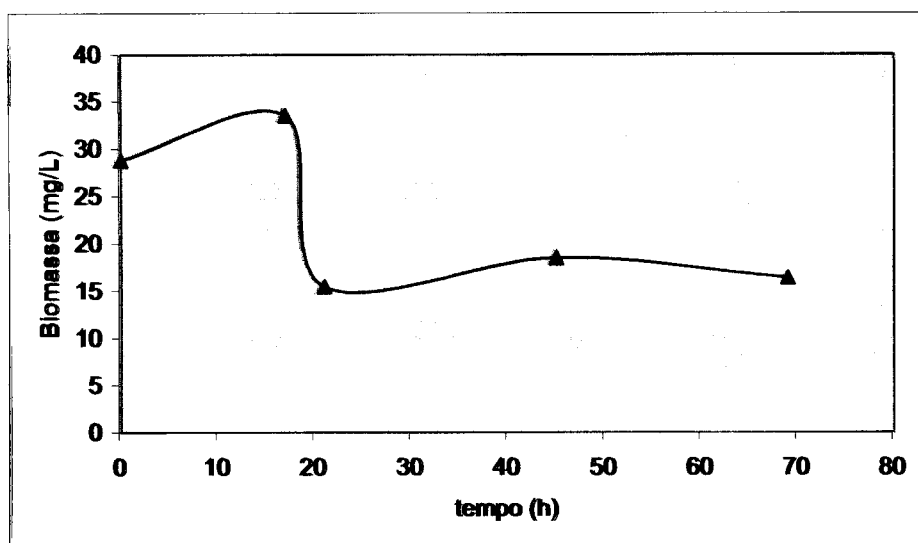


Figura 6. Resultado do ensaio realizado em meio com peptona e 2,8% de NaCl, em anaerobiose, sem KNO_3 , a 25°C.

3.2.3. Avaliação do crescimento, em condições anaeróbias, com diferentes fontes de carbono e razões C/N

Utilizando meio mínimo em condições anaeróbias, com 0,3 g de KNO_3 e diferentes fontes de carbono numa razão C/N=1.0, a diferença entre a biomassa formada com glucose, acetato e metanol (figura 7) não foi significativa (ANOVA, $p>0,05$). O mesmo sucedeu com as respectivas taxas de crescimento (tabela 2), que oscilaram entre 0,03-0,04 h^{-1} . A diferença entre o controlo e as restantes fontes de carbono foi significativa (ANOVA, $p<0,05$). No controlo, que não continha nenhuma fonte de carbono, não houve crescimento.

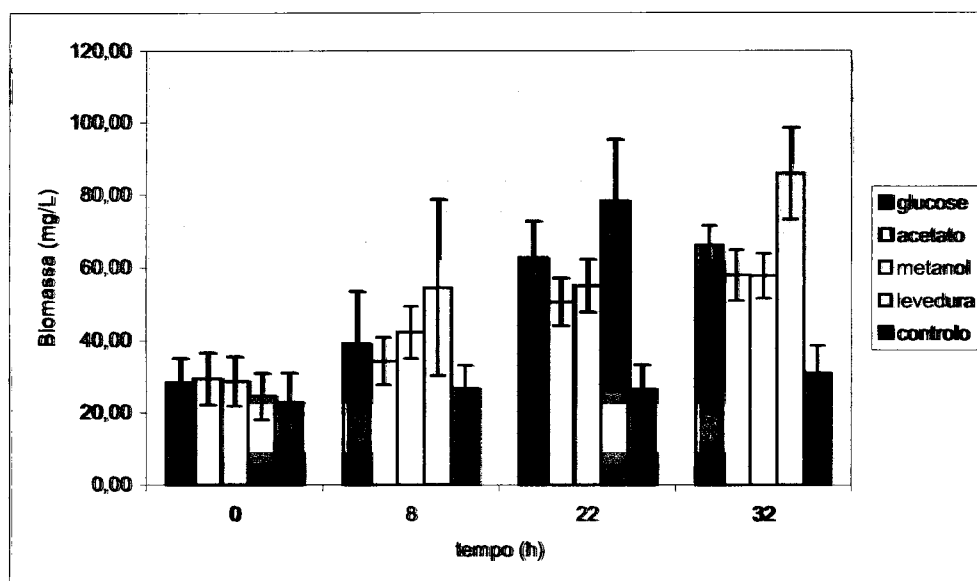


Figura 7. Biomassa (mg/L) formada em condições anaeróbias, à temperatura de 25 °C, com meio mínimo e uma razão C/N = 1,0, para as seguintes fontes de carbono: glucose, acetato, metanol, levedura.

Tabela 2: Taxas de crescimento (h^{-1}) obtidas em meio mínimo com levedura, glucose, acetato e metanol. No controlo não se usou fonte de carbono.

Fontes de carbono	Razão C/N		
	Anaerobiose		Aerobiose
	1.0	2.0	1.0
levedura	0,05*	0,13**	0,13*
glucose	0,04	0,03	0,08
acetato	0,03	0,02	0,07
metanol	0,03	0,01	0,04
controlo	0,01	0,01	0

* A concentração da levedura é de 3 g/L.

** A concentração da levedura é de 6 g/L.

Observa-se, ainda, que o crescimento com extracto de levedura é superior às outras fontes de carbono usadas, atingindo-se uma biomassa máxima de 86 mg/L. A levedura já tinha sido utilizada como fonte de carbono, numa concentração de 3 g/L, em ensaios anteriores. Por esta razão, a mesma é utilizada nesta experiência, na mesma concentração, não para estudar a influência da razão C/N, mas para servir de referência

para os ensaios realizados com as outras fontes de carbono. Os resultados obtidos no ensaio realizado com uma razão C/N de 2.0 são ligeiramente diferentes dos obtidos anteriormente (figura 8). Com efeito, a estirpe T2 neste caso não cresce com metanol e as taxas de crescimento com glucose e acetato continuam a ser semelhantes, mas ligeiramente inferiores às do ensaio em que se testou um meio com uma razão C/N de 1.0 (tabela 2). No entanto, a biomassa máxima produzida nestas condições é cerca de 40 % superior para a glucose e 26 % para o acetato. De notar que neste ensaio a concentração de levedura foi de 6 g/L e por isso a diferença de crescimento relativamente às outras fontes de carbono, foi ainda mais significativa. Comparando os dois ensaios verifica-se que a taxa de crescimento com levedura duplicou (tabela 2) e a biomassa máxima aumentou cerca de 300 % no segundo caso de estudo.

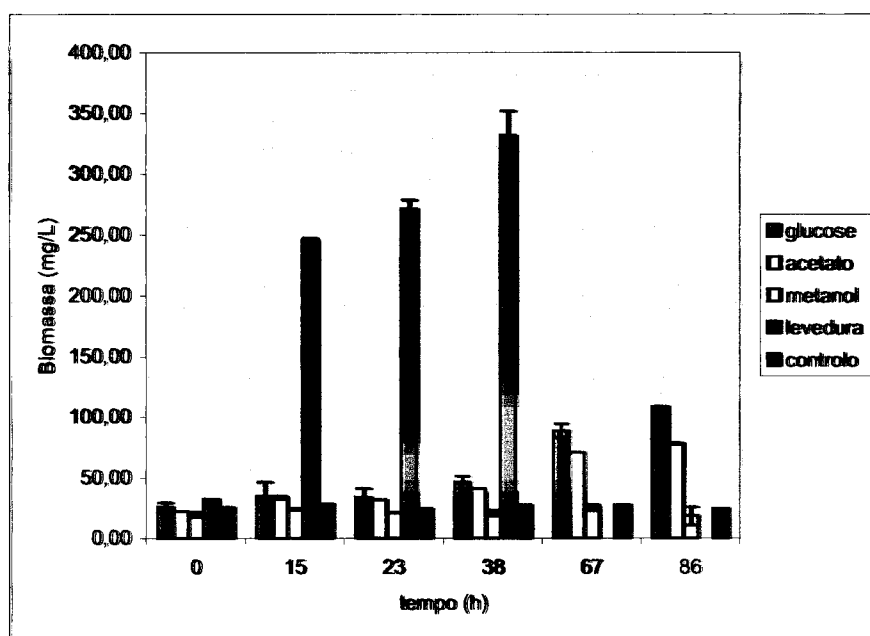


Figura 8. Biomassa (mg/L) formada, usando meio mínimo, à temperatura de 25 °C, em condições anaeróbias com uma razão C/N = 2.0 e com as seguintes fontes de carbono: glucose, acetato, metanol, levedura. Como controlo foi usado meio mínimo sem qualquer fonte de carbono.

Os resultados obtidos com uma razão C/N=1.0 em condições aeróbias permitem considerar 3 grupos distintos (figura 9), de acordo com a taxa de crescimento e a biomassa formada (ANOVA e teste N-K $p < 0,05$): (1) levedura; (2) glucose e acetato; (3) metanol. Como aconteceu nos estudos anteriores, o crescimento com levedura foi mais eficiente do que com as restantes fontes de carbono. Entre a glucose e o acetato

não existem diferenças significativas (ANOVA, $p > 0,05$), mas quando se compara o crescimento com estas fontes de carbono e o controlo, onde não ocorreu crescimento, a diferença é significativa (ANOVA e teste N-K $p < 0,05$). A biomassa produzida no meio com metanol é ligeiramente superior à do controlo; no entanto, não existe uma diferença significativa entre estes meios (ANOVA, $p > 0,05$).

As taxas de crescimento nos meios com levedura, glucose e acetato duplicaram relativamente aos valores obtidos na ausência de oxigénio (tabela 2). A formação de biomassa com estas fontes de carbono em aerobiose foi superior em 320 % para a levedura e 38 % para a glucose e o acetato, relativamente aos ensaios em anaerobiose.

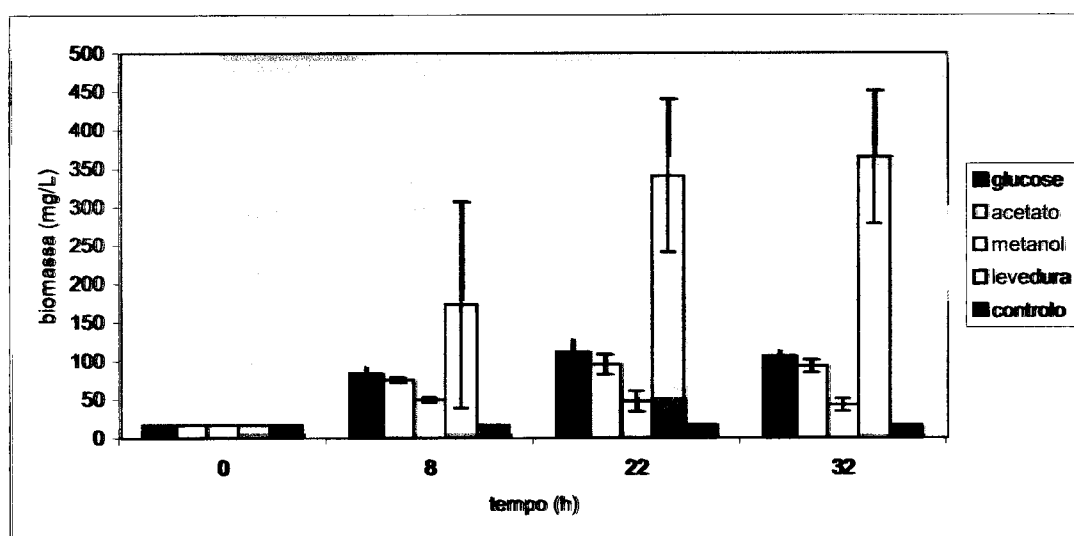


Figura 9. Biomassa (mg/L) formada usando meio mínimo, à temperatura de 25 °C, em condições aeróbias com uma razão C/N=1.0, com as seguintes fontes de carbono: glucose, acetato, metanol, levedura. Como controlo foi usado meio mínimo sem qualquer fonte de carbono.

3.3. Caracterização do processo de desnitrificação

Foram efectuadas três séries experimentais, em anaerobiose, com duplicados, para o meio com peptona e 1 g/L de KNO_3 (10 mmol/L N-NO_3^-). Contudo, conforme será referido posteriormente no ponto 3.5 foram efectivamente doseados 300 mg/L (20 mmol/L) de N-NO_3^- no meio, no início das experiências. A estirpe T2 apresentou uma taxa de crescimento que variou entre 0,04 a 0,09 h^{-1} e uma biomassa máxima entre 150 a 240 mg/L. A taxa específica de redução do N-NO_3^- variou entre 1,2 a 10,4 mg N-NO_3^- /(g biomassa.h) e o N-NO_2^- foi produzido a uma velocidade de 5 a 6 mg/L/h. O

segundo passo da desnitrificação, isto é, a redução de N-NO_2^- aconteceu a uma taxa específica de 2 a 5,6 $\text{mg N-NO}_2^-/(\text{g biomassa.h})$ (tabela 3).

Tabela 3. Caracterização do processo de desnitrificação anaeróbia, em meio com peptona e meio mínimo, com 0,3 e 1g de KNO_3/L a 25 e 30 °C.

	Símbolo	Unidades	Meio com peptona 1g/L de KNO_3	Meio mínimo com 0,3 g/L de KNO_3	
			25 °C	25 °C	30 °C
Taxa de crescimento	μ	h^{-1}	0,04-0,09	0,01	0,06
Biomassa máxima	m	mg/L	150-240	91,73	131,76
Taxa específica de redução do NO_3^-	Q_{nitrito}	$\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{g biomassa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	1,20-10,40	13,00	7,50
Taxa específica de redução do NO_2^-	Q_{nitrito}	$\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{g biomassa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	2,00-5,60	8,20	*

* Este parâmetro não foi calculado porque não foram detectados nitritos com a técnica analítica usada.

Quer o N-NO_3^- , quer o N-NO_2^- , foram totalmente reduzidos em cerca de 40 horas em qualquer uma das séries experimentais efectuadas, conforme exemplificado pela figura 10.

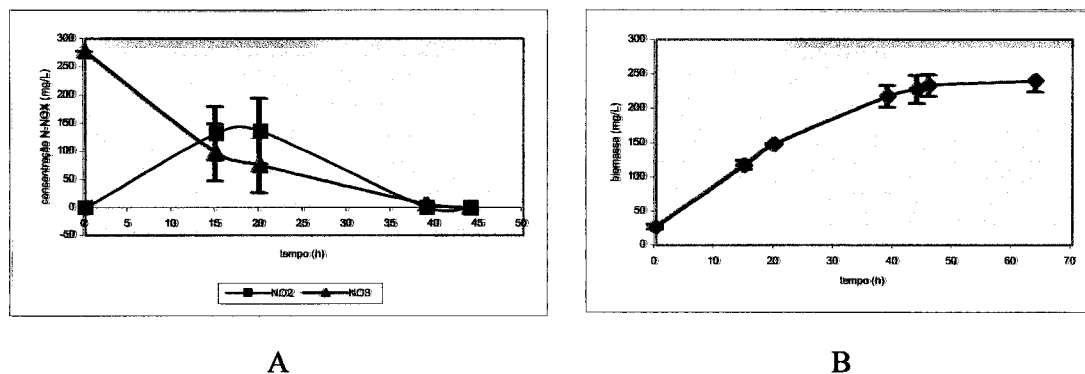


Figura 10. Exemplo do perfil evolutivo do N-NO_3^- e do N-NO_2^- (a) e da biomassa (b) num meio com peptona e com 300 $\text{mg N-NO}_3^-/\text{L}$, a uma temperatura de 25 °C.

Nos ensaios realizados verificou-se que quando o N-NO_2^- atingia a concentração máxima de 110 a 130 mg/L a velocidade de redução do N-NO_3^- diminuía e só voltava a aumentar depois da concentração de N-NO_2^- começar a diminuir. Um exemplo elucidativo deste comportamento pode ser observado na figura 10.

Como o N-NO_3^- doseado (20 mmol/L) no meio com peptona, não correspondia à quantidade efectivamente adicionada, testou-se um meio mais simples, o meio mínimo com extracto de levedura. Quando a estirpe T2 foi cultivada anaerobicamente em meio mínimo com 40 mg/L de N-NO_3^- e extracto de levedura, à temperatura de 25 °C, a taxa de crescimento e a biomassa máxima produzidas foram inferiores aos resultados obtidos com o meio anterior (figura 11). No entanto, os resultados referentes à desnitrificação parecem demonstrar que este processo foi mais eficiente com meio mínimo suplementado com levedura, apresentando uma taxa específica de redução do N-NO_3^- de 13,0 mg N-NO_3^- /(g biomassa.h) e do N-NO_2^- de 7,50 mg N-NO_2^- /(g biomassa.h). A uma temperatura controlada de 30 °C a taxa de crescimento e a biomassa máxima aumentam, respectivamente, 80 e 70 % (figura 12). Por outro lado, neste ensaio realizado a uma temperatura mais elevada a taxa específica de redução do nitrato diminui para 8,20 mg N-NO_3^- /(g biomassa.h) (tabela 3).

De referir, ainda, que no ensaio realizado à temperatura de 30 °C, não foi possível detectar a presença de nitritos. Provavelmente a concentração de nitritos estaria abaixo do limiar da técnica usada.

Em todas as experiências realizadas observou-se que a entrada das culturas em fase estacionária coincidia com a ausência de nitratos e nitritos nos meios. Este facto é particularmente evidente no meio com peptona, onde o carbono não será um factor limitativo (figura 10).

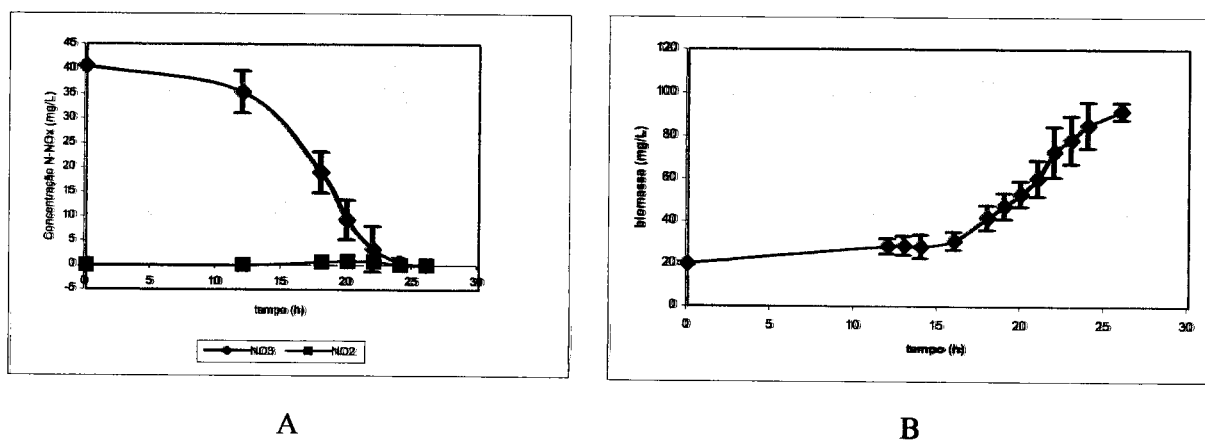


Figura 11. Perfil evolutivo do N-NO_3^- e N-NO_2^- (A) e da biomassa (B) num meio mínimo com 40 mg/L N-NO_3^- /L e extracto de levedura, a temperatura ambiente de 25 °C.

Comparando o perfil de crescimento da bactéria nos dois meios para a mesma temperatura (figuras 10 e 11), constata-se que no meio mínimo ocorreu uma fase lag que durou entre 11 a 15 horas, enquanto que no meio com peptona esta fase não é evidente. Estes resultados poderão estar relacionados com o modo de preparação do inóculo bacteriano (em anaerobiose com MP e em aerobiose com MM).

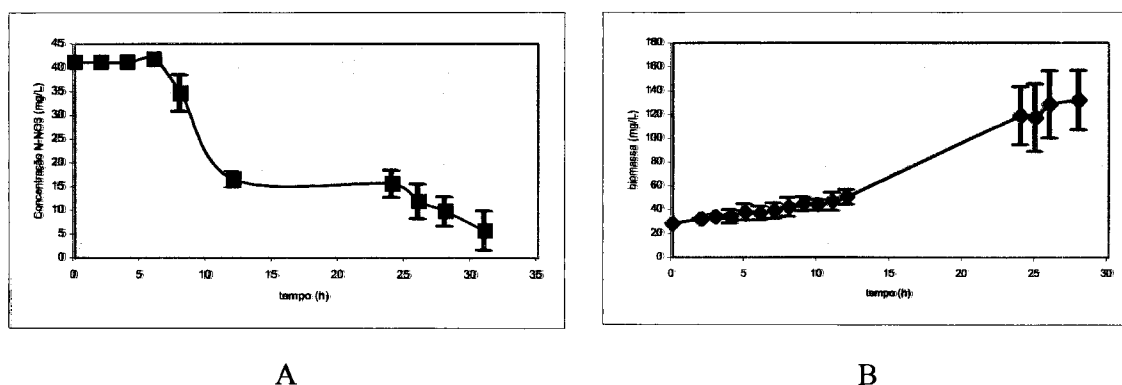


Figura 12. Perfil evolutivo do N-NO₃⁻ (A) e da biomassa (B) num meio mínimo com 40 mg N-NO₃⁻/L e extracto de levedura, a uma temperatura controlada de 30 °C.

3.4. Estudo da adsorção a diferentes matrizes

O ensaio realizado para estudar a capacidade de adsorção da estirpe T2 aos substratos carvão, leca e acrílico, foi feito em duplicado e teve uma duração de 7 dias. A capacidade de adsorção foi avaliada através da análise da variação da concentração da biomassa no sobrenadante por leitura da densidade óptica a 600 nm e da contagem de U.F.C. no sobrenadante e no material extraído dos próprios suportes.

No final da experiência verificou-se uma diminuição da biomassa no sobrenadante de cada um dos substratos, e também no controlo (figura 13).

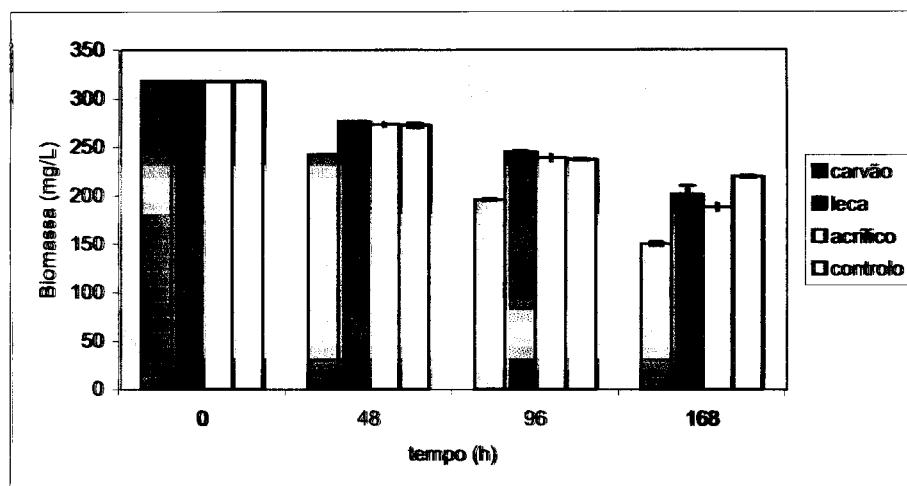


Figura 13. Variação da biomassa (mg/L) observada no sobrenadante dos 3 grupos de estudo (carvão, leca, acrílico) e no controle, ao longo do tempo experimental.

Os resultados obtidos podem ser divididos em 3 grupos de acordo com a diminuição da biomassa observada no sobrenadante: (1) o carvão com 53 % de redução; (2) a leca e o acrílico com 37 % e 41 %, respectivamente; (3) o controle com 30 %. A diferença entre estes 3 grupos é significativa (ANOVA e teste N-K, $p < 0,05$).

Quanto à variação do valor dos U.F.C./ml no sobrenadante (figura 14) e após normalização dos valores iniciais, verificou-se que as diminuições observadas foram de 89 % para o carvão, 67 % para a leca e 73 % para o acrílico e controle. Do ponto de vista estatístico (ANOVA, $p > 0,05$) não existem diferenças significativas para os grupos leca, acrílico e controle, destacando-se apenas o grupo representado pelo carvão activado granular.

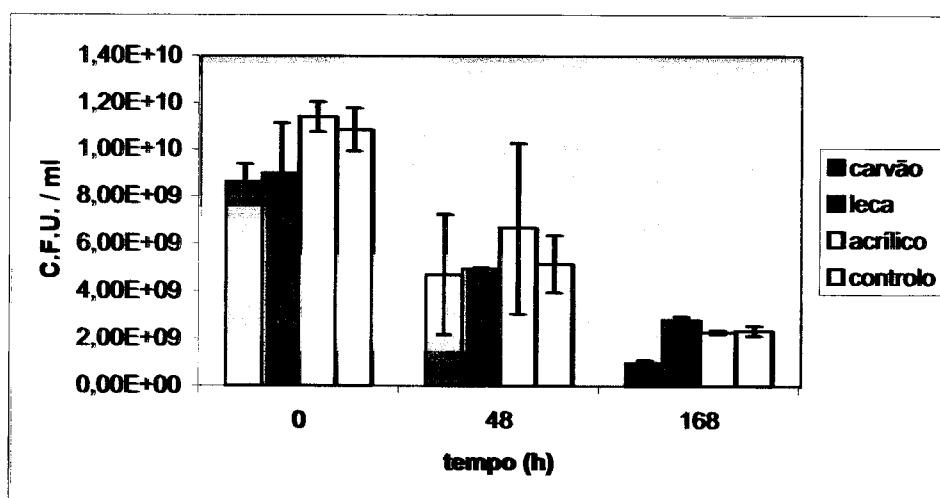


Figura 14. Valores de U.F.C./ml no sobrenadante das suspensões com cada um dos 3 materiais em estudo (carvão, leca, acrílico) e no controle.

No entanto, as tendências observadas usando os dois métodos de avaliação da adsorção são de algum modo concordantes, isto é, o carvão parece ser o substrato onde se verifica uma maior adsorção. O mesmo se verifica quando se analisam os resultados relativamente a U.F.C. extraídas das matrizes usadas (figura 15). O número de colónias viáveis da bactéria T2 aderidas ao carvão, leca e acrílico foi, respectivamente, de $1,26 \times 10^9$, $7,33 \times 10^8$ e $1,10 \times 10^9$ U.F.C./g de matriz.

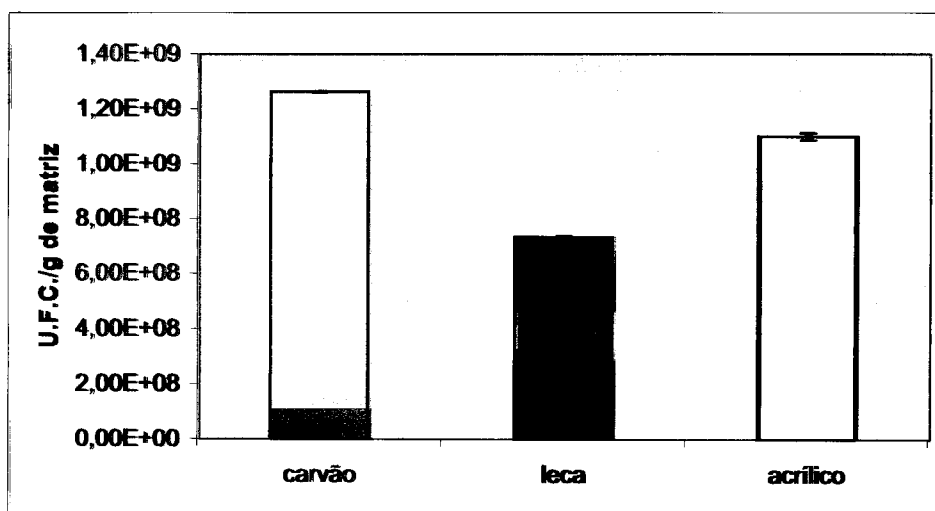


Figura 15. Valores observados de U.F.C./ g de substrato (carvão, leca e acrílico).

Verifica-se, no entanto, que a diferença entre o carvão e o acrílico não é tão distinta como sucedia nas análises anteriores e que os valores mais baixos foram obtidos com a leca. De referir, ainda, que para todas as situações estudadas se verificou que no final da experiência não tinha havido contaminações, ou seja, as culturas tinham-se mantido puras

3.5. Técnicas analíticas usadas e suas adaptações

3.5.1. Avaliação de possíveis interferências com as técnicas usadas

Os meios utilizados nos ensaios realizados para a avaliação da cinética da desnitrificação continham 4 e 10 mmol/L de N-NO_3^- , o que ultrapassava o limite superior da técnica de doseamento de nitrato que é de 20 $\mu\text{mol/L}$, tendo levado à necessidade de efectuar grandes diluições das amostras. No entanto, as diferenças

observadas entre as diferentes diluições da mesma amostra e entre os triplicados de cada diluição não foram significativas (ANOVA, $p > 0,05$), o que demonstrou a precisão do método.

Conforme referido, algumas das amostras continham resazurina, conferindo ao meio uma cor rosa que podia interferir na leitura da densidade óptica durante o processo de doseamento de nitrato ou nitrito. Verificou-se, contudo, que para as diluições de 1:100, 1:50 e 1:10 as diferenças observadas entre as amostras com ou sem resazurina, estavam abaixo do limite inferior da técnica ($1 \mu\text{moles/L}$) e por isso eram negligenciáveis. Contudo, para uma diluição de 1:5 a resazurina interfere na leitura da densidade óptica introduzindo um erro compreendido entre 1 a $1,5 \mu\text{moles/L}$.

Como já foi referido, a concentração de N-NO_3^- doseado não correspondia à quantidade inicialmente adicionada ao meio com peptona. Por este motivo, realizaram-se algumas experiências em que se adicionaram quantidades conhecidas de N-NO_3^- e N-NO_2^- ao meio com peptona e a amostras retiradas no fim dos ensaios relativos ao processo da desnitrificação. As diferenças entre as concentrações determinadas e as concentrações esperadas também não foram significativas (t-student, $p > 0,05$). Por isso não se pode concluir que as interferências se deviam ao meio com peptona. As mesmas poderiam resultar de alterações produzidas pelo crescimento bacteriano. Deste modo, meios com composição indefinida e muita matéria orgânica não serão de aconselhar para este tipo de estudos.

4. Discussão

4.1. Descrição da bactéria T2

Tradicionalmente, a identificação das espécies bacterianas tem sido realizada usando métodos fenotípicos clássicos, como é o caso do crescimento em meios específicos, reacções enzimáticas e microscopia (Johnsen et al., 1996). Contudo, estes métodos são morosos e muitas vezes pouco apropriados para estabelecer relações filogenéticas entre bactérias próximas. Os métodos de identificação têm evoluído no sentido de melhorar e simplificar a identificação e a caracterização. Um exemplo desta evolução é o sistema vulgarmente utilizado e comercialmente disponível, em Kit, o API 20NE da BioMérieux (Johnsen et al., 1996). Contudo, a base de dados destes Kits para identificação baseia-se sobretudo em situações clínicas e não ambientais. Por este motivo, os Kits podem falhar na identificação de espécies isoladas do meio ambiente (OECD, 1997).

Os resultados dos testes API e dos testes fisiológicos realizados neste trabalho com a estirpe T2 foram os seguintes: a bactéria é catalase e oxidase positiva, hidrolisa a arginina, a esculina e a gelatina mas não possui a urease, nem a pneumolisina. Consegue assimilar a D-glucose, D-manose, N-acetil-D-glucosamina, o gluconato, o caprato, o L-malato e o citrato. O mesmo não sucede com a B- galactosidase, a L-arabinose, o D-manitol, a maltose, o adipato e o fenilacetato. Cresce em meio PAB, e produz pigmentos fluorescentes em meio King's B. Por outro lado, não ocorre hemólise em meio de sangue de ovelha e não ocorre crescimento a uma temperatura de 41 °C. O perfil obtido no teste API permitiu, conforme referido, classificar a estirpe T2 como *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, segundo o Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey, a *Pseudomonas aeruginosa* consegue crescer a 41 °C, o que não acontece com a *Pseudomonas fluorescens* e com a espécie T2.

Esta incerteza na identificação efectuada não é de estranhar pois a classificação das estirpes de *Pseudomonas* é problemática devido à falta de um sistema taxonómico apurado (Tryfinopoulos et al., 2002) Por isso, a maior parte das espécies deste género estão mal definidas nas publicações de diversos investigadores, que usam apenas os testes mencionados anteriormente.

Por outro lado, os métodos moleculares são ferramentas poderosas não só para a identificação até ao nível da espécie, mas também para a caracterização das diferentes

estirpes (Tryfinopoulos et al., 2002). A análise molecular mais usual na classificação das *Pseudomonas* baseia-se nas semelhanças do DNA para o gene 16S rRNA (OECD, 1997). A forte pressão da selecção para a conservação da estrutura molecular e sequência do DNA 16S rRNA torna estas moléculas em relógios evolutivos bastante importantes para descrever as relações filogenéticas entre o rRNA do grupo das *Pseudomonas*. A sequenciação do gene 16S rRNA realizada para a bactéria T2 apresentou uma similaridade elevada (98-99 %) com as espécies: *P. gessardii*, *P. libanensis*, *P. synxantha*, *P. reactans*, e *P. fluorescens*. Este resultado vem confirmar que a bactéria T2 e a *Pseudomonas aeruginosa* não pertencem à mesma espécie. No entanto, as mesmas fazem parte do subgrupo I, de acordo, com similaridade rRNA/DNA do género *Pseudomonas* (Krieg e Holt, 1984). Este grupo inclui pseudomonas fluorescentes saprófitas e fitopatogénicas, as espécies desnitrificantes não pigmentadas e as estirpes não pigmentadas que pertencem ao grupo “alcaligenes”. A bactéria T2 é, segundo estes resultados, uma espécie muito próxima da *Pseudomonas fluorescens*, apresentando muitas características em comum: produzem pioverdina, possuem a gelatinase, e a arginina hidrolase, não conseguem crescer a 41 °C e alguns dos biovars conseguem realizar a desnitrificação (Krieg et al., 1984). A *Pseudomonas fluorescens* pode ser encontrada na água e no solo, dos quais pode ser isolada através de um meio de enriquecimento contendo várias fontes de carbono, incubada em condições aeróbias. Alguns biovars desta espécie podem crescer num meio com nitratos, em condições anaeróbias. A temperatura óptima encontra-se num intervalo compreendido entre 25-30 °C. A *Pseudomonas reactans* é também uma espécie relacionada com *Pseudomonas fluorescens* que se distingue dos biovars III e IV por duas razões: é patogénica para cogumelos (descoloração ou “blotch disease”); produz um lipopeptídeo (LDP) denominado tolasina, que rompe membranas celulares e tem propriedades surfactantes (Godfrey et al., 2001; Munsch et al., 2000). A *Pseudomonas gessardii* foi isolada de águas minerais naturais francesas e descrita pela primeira vez em 1999. Possui características morfológicas comuns a todas as pseudomonas e algumas características fenotípicas diferentes: as estirpes de *P. gessardii* utilizam L – arabitol, mio-inositol, adonitol, xilitol e meso-eritritol como fontes e carbono (Verhille et al. 1999). A *Pseudomonas libanensis* foi isolada de águas de nascente do Líbano e é membro de um novo subcluster (Vb) e contém 7 estirpes. As diversas estirpes são fenotipicamente e genotipicamente homogéneas e diferenciam-se da maior parte das *Pseudomonas* por vários caracteres fenotípicos e de todos os biovars de *P. fluorescens*

pela assimilação de alfa-aminobutirato (Dabboussi et al, 1999). A *Pseudomonas synxantha* também pertence ao subgrupo da *Pseudomonas fluorescens* apresentando as características fisiológicas típicas deste grupo, pois é oxidase e catalase positiva, produz pioverdina, possui a enzima arginina hidrolase e a gelatinase, e não cresce a 41 °C. Utiliza N-Acetilglucosamina, arabinose, caprato, citrato, eritritol, glucose, m-inositol, malato, manitol, sorbitol e trehalose. Por outro lado, não metaboliza adipato, citraconato e fenilacetato. Ao contrário de outras *Pseudomonas* deste sub-grupo não realiza a desnitrificação (Pirtillä et al, 2000).

Paralelamente à sequenciação do gene 16S rRNA realizou-se uma análise dos ácidos gordos celulares que é um método fenotípico evoluído e que tem demonstrado ser mais eficiente e fiável na identificação de *Pseudomonas spp* do que os métodos fenotípicos clássicos (Tryfinopoulos et al., 2002). Nesta técnica o perfil de ácidos gordos desconhecido é comparado com uma base de dados extensa que inclui muitas *Pseudomonas*. Apesar de este sistema permitir uma identificação até ao nível da espécie, não consegue identificar todos organismos isolados de diferentes ambientes, pois muitos ainda não foram descritos. Em relação à bactéria T2 os resultados deste teste são característicos do género *Pseudomonas*, confirmando os testes fenotípicos clássicos efectuados. A sequência do gene 16S rRNA da bactéria T2 foi depositada no GenBank (NCBI) com o ACC: AY874539.

4.2. Características do crescimento da *Pseudomonas* isolada

O efeito da salinidade no comportamento da bactéria T2 foi avaliado através da formação de biomassa e não pela sua performance de desnitrificação. Contudo, a maior parte dos estudos existentes apontam para uma inibição deste processo à medida que aumenta a salinidade (Glass e Silverstein, 1999) e por extensão, é natural que a formação de biomassa também seja afectada. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho não são muito claros. Com efeito, o estudo realizado a uma temperatura de 25 °C parece indicar que o crescimento é mais eficiente sem NaCl, pois a taxa de crescimento foi ligeiramente superior, apesar de não haver diferenças significativas quanto à biomassa máxima formada com NaCl. A uma temperatura de 30 °C as taxas de crescimento são semelhantes, mas a presença de NaCl parece afectar negativamente o crescimento bacteriano formando-se, por um lado, menos biomassa e por outro atingindo-se mais cedo a fase estacionária.

Contudo, para uma mesma salinidade, o efeito da temperatura no crescimento desta bactéria corresponde ao esperado: para uma temperatura superior as taxas de crescimento são mais elevadas e a bactéria T2 demora metade do tempo para atingir a biomassa máxima.

Segundo Prescott et al. (2002), os microrganismos do género *Pseudomonas* crescem a temperaturas da gama mesofílica. Neste intervalo (25-30 °C) a actividade biológica aumenta com a temperatura, atingindo um valor máximo aproximadamente aos 31 °C (Eckenfelder, 1989). Verifica-se que o aumento da temperatura de 25 para 30 °C pode estar na origem de um aumento considerável da taxa de crescimento, e, logo, da biomassa formada.

O crescimento em meio com peptona foi mais eficiente do que em meio mínimo suplementado, e isto talvez porque a quantidade de carbono e de factores de crescimento presentes no meio enriquecido é bastante superior ao do meio mínimo.

Como a fonte de carbono usada pode afectar a eficiência da desnitrificação (Menasveta et al., 2001) analisou-se o comportamento da bactéria, em anaerobiose, em meio mínimo com metanol, glucose ou acetato, pois constituem fontes externas de carbono muito utilizadas no processo de desnitrificação nos sistemas de tratamento de efluentes (Wasik et al., 2001). A melhor performance foi observada com o extracto de levedura, seguido da glucose, metanol e acetato. Numa razão C/N=2.0 não ocorreu crescimento com metanol, apesar deste substrato ser considerado, por autores como Lee et al. (2000), a fonte de carbono mais eficiente na desnitrificação biológica em sistemas de recirculação da água em piscicultura.

O crescimento em ambiente aeróbio para uma razão C/N=1.0 foi superior com todas as fontes de carbono usadas, à excepção do metanol, para o qual não ocorreu crescimento. Os maus resultados obtidos com o metanol também se verificaram num estudo realizado por Kariminiaae-Hamedani et al. (2004) com uma estirpe muito próxima da *Pseudomonas stutzeri*, em água salgada, e em que a mesma não cresceu com metanol ou sacarose como únicas fontes de carbono. Num estudo realizado por Hallin e Pell (1998) num sistema de tratamento de efluentes por lamas activadas observou-se que a fonte externa de carbono condicionava a constituição da população desnitrificante. Das fontes de carbono estudadas, o metanol era aquela para a qual a população desnitrificante demorava mais tempo a adaptar-se. Segundo estes autores, eram precisas pelo menos 70 horas para o processo estabilizar com o metanol. Este seria o tempo necessário para acontecer uma selecção ecológica a favor das populações desnitrificantes especializadas

no metanol. A fonte de carbono mais eficiente foi o acetato, com o qual se verificou uma taxa de desnitrificação de $7,0 \text{ h}^{-1}$ e a glucose, que também foi testada, apresentou uma taxa de desnitrificação de $2,5 \text{ h}^{-1}$ semelhante à observada com o metanol.

Lee e Welander (1996) realizaram um estudo com um consórcio de bactérias desnitrificantes para testarem diferentes fontes de carbono, entre as quais o metanol e o acetato. O crescimento e taxa de desnitrificação das bactérias no meio enriquecido com estas fontes de carbono foram lentos, mas o processo de desnitrificação tornou-se mais eficiente quando se adicionou extracto de levedura ao meio. Entre estes dois compostos, o acetato promoveu uma taxa de crescimento de $0,091 \text{ h}^{-1}$ e o metanol $0,028 \text{ h}^{-1}$. Estes resultados assemelham-se ao comportamento da bactéria T2.

4.3. Caracterização do processo de desnitrificação

Os ensaios sobre desnitrificação efectuados neste trabalho foram realizados em sistema fechado, com uma salinidade de 2,8 %, usando-se dois meios: (1) meio com peptona e 300 mg/L de N-NO_3^- ; (2) meio mínimo com razão C/N=1.0 e uma concentração de 40 mg/L de N-NO_3^- . Como já foi referido, a concentração de N-NO_3^- doseada no meio com peptona não correspondia à quantidade adicionada a este. O meio com peptona é um meio complexo, que apresenta uma elevada carga orgânica que pode interferir com a técnica de redução do nitrato (Jones, 1984). A composição deste meio não é totalmente conhecida, e sabe-se que determinados metais e fosfatos também podem provocar interferências no doseamento dos nitratos (Jones, 1984). No entanto, como as análises em meio dopado com KNO_3 não mostraram qualquer interferência, as discrepâncias observadas poderão ter resultado do metabolismo bacteriano. Devido a estes factores mudou-se o para um meio mais simples, o meio mínimo, com extracto de levedura como fonte de carbono. A escolha deste meio e fonte de carbono deveu-se a várias razões: (1) em ensaios anteriores realizados neste trabalho a bactéria T2 apresentou uma boa taxa de crescimento com o extracto de levedura; (2) o extracto de levedura é utilizado com frequência nos sistemas de tratamento para melhorar as performances do processo de desnitrificação (Lee e Welander, 1996); (3) com o meio mínimo, a concentração de N-NO_3^- doseado (41 mg/L ou 4 mmoles/L) correspondeu à quantidade adicionada ao meio; (4) este meio tem uma composição conhecida e permite comparações com os trabalhos de outros autores.

Outro aspecto a considerar relaciona-se com o inóculo usado, que para os ensaios em meio com peptona cresceu em ambiente anóxico, enquanto que o inóculo usado nas experiências com meio mínimo foi preparado em condições aeróbias. Este facto pode explicar a não ocorrência da fase lag no início dos processos de crescimento e de desnitrificação anaeróbios do primeiro grupo de trabalho e a sua existência no segundo grupo. Liu et al. (1998) descreveram este fenómeno pela primeira vez quando realizaram um estudo com uma cultura pura de *Pseudomonas denitrificans*, submetida a um período de arejamento seguido de uma fase anóxica. A mudança do receptor de electrões, do oxigénio para nitratos, reflectiu-se num perfil de crescimento com duas fases exponenciais e numa fase lag intermédia que variou entre as 3 e as 6 horas de duração. Estes autores observaram, ainda, que a duração dessa fase lag variou conforme a extensão do período de arejamento. Isto é, quanto maior fosse este, maior era a fase lag. Concluíram, também, que na fase de arejamento a presença ou ausência de nitratos não se reflectia posteriormente na cinética da bactéria. Todavia, outros autores (Gouw et al., 2001) contrariam a afirmação de que a presença de nitratos na pré cultura não influencia a extensão da fase lag. Na realidade, esses estudos indicaram que a presença de nitratos na fase aeróbia diminuía a fase lag subsequente, e isso provavelmente porque a presença de nitrato induzia a produção das enzimas redutases durante a fase de exposição ao oxigénio e, por este motivo, encurtavam a fase lag. Estes autores concluíram, então, que as condições da pré cultura eram determinantes para a eficiência do processo. Mais ainda, acrescentaram que, se a pré cultura crescer em ambiente anóxico com nitratos, a fase lag que sucede após o período de arejamento não ultrapassará uma hora. O mesmo se verificou nos ensaios realizados no meio com peptona em que a pré cultura foi preparada em anoxia e na presença de nitratos.

No presente trabalho os períodos lag duraram 11 a 15 horas e caracterizaram-se por baixas taxas de redução de nitratos e nitritos. O final da fase lag foi marcado pelo crescimento exponencial da biomassa e por taxas de redução do nitrato mais elevadas. No meio que apresentava uma concentração inicial de 300 mg/L de N-NO_3^- , a taxa de redução dos nitratos abrandou consideravelmente quando a concentração de nitritos atingiu um pico de $126,45 \pm 11,05$ mg/L. Provavelmente, a desnitrificação terá sido inibida pela acumulação de nitritos. Tal comportamento está descrito na literatura, e, por exemplo, Glass e Silverstein (1998) constataram que, a um pH neutro, uma concentração de 30 a 250 mg/L N-NO_2^- podia inibir a desnitrificação. Ainda reforçando esta ideia, Constantin e Fick (1997) referem que a desnitrificação para uma

concentração de nitratos inferior a 10 mmol/L (140 mg/L) é eficiente e rápida. Contudo, uma concentração superior a esta (como acontece com o presente estudo em que a concentração inicial de N-NO_3^- era de 10 mmol/L) resulta na acumulação transitória de nitritos e inibição do crescimento bacteriano.

Comparando os dois meios usados neste estudo, observou-se que a taxa de crescimento e a biomassa máxima formada eram superiores no grupo que cresceu no meio rico em fonte de carbono. Talvez por isso se possa pensar que o carbono tenha sido um factor limitativo no crescimento da bactéria no ensaio com uma razão $\text{C/N}=1.0$ e cuja concentração de N-NO_3^- era de 40 mg/L. Por outro lado, os resultados sugerem que a desnitrificação a uma temperatura de 25 °C foi mais eficiente neste último grupo, pois as taxas de redução do nitrato foram superiores em 55 %. Para além disto, a desnitrificação estava concluída no final de 24 horas (ausência de nitratos e nitritos), ao contrário do que aconteceu no meio com uma carga orgânica mais elevada, em que este processo só estava concluído ao fim de 40 horas (figuras 10 e 11).

No entanto, no ensaio realizado com meio mínimo, esperar-se-ia que, ao aumentar a taxa de crescimento devido ao aumento da temperatura de 25 para 30 °C, houvesse um correspondente aumento da taxa de redução de nitrato, o que não aconteceu. Este comportamento é também descrito por Park et al. (2001) que ao desenvolverem um sistema de recirculação num aquário de água salgada verificaram que à medida que a temperatura diminuía (27-28, 20-23, e 17-18 °C) as taxas específicas de redução de nitratos também diminuía.

Os valores da cinética de desnitrificação obtidos enquadram-se com outros resultados referidos na literatura (tabela 4). De notar que a maior parte dos estudos sobre a desnitrificação são realizados com consórcios bacterianos e por isso não existem muitos dados com culturas puras (Martienssen e Schops, 1997).

No presente trabalho, a desnitrificação foi avaliada com uma fonte de carbono que não é usualmente empregue em grande escala. Seria útil experimentar outros compostos como o acetato, pois Lee e Welander (1996), por exemplo, obtiveram taxas de redução do nitrato da ordem de 76 h^{-1} com este composto.

Tabela 4. Valores da cinética da desnitrificação referenciados na literatura consultada e no presente trabalho.

Referências	Sistema usado	Microrganismos	Taxa de crescimento (h^{-1})	Taxa específica de redução de nitrato ($mg\ N-NO_3\ g\ biomassa^{-1}\ h^{-1}$)
Aboutboul et al. (1995)	Sistema FBR	Consórcios	-----	76,2-92,4
Wisniewski et al. (2001)	“Batch”	Consórcios	-----	12,5
Glass e Silverstein (1998) (elevada concentração de NaCl e KNO_3)	Sistema SBR	Consórcios	-----	23-54
Glass e Silverstein (1999) (elevada concentração de NaCl e KNO_3)	Sistema SBR	Consórcios	-----	19-50
Lee e Welander (1996)	“Batch”	Consórcios	0,062-0,091	29-49
Panswad e Anan (1999)	Sistema A/A/A	Consórcios	-----	2,5 (0 % de NaCl) 1,2 (3,0 % de NaCl)
Cattaneo et al. (2003)	Sistema FBBR	<i>Pseudomonas</i>	0,006 (FBBR)	3,75-5,41 (FBBR)
	Sistema STR	<i>denitrificans</i>	0,005 (STR)	2,08-5,16 (STR)
Kornaros e Lyberatos (1998)	“Batch”	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	0,1	
Presente estudo*	“Batch”	bactéria T2	0,04-0,09	1,2-10,4 (M.P.)
		<i>(Pseudomonas)</i>	0,013	13,0 (M.M. 25 °C)
			0,06	7,5 (M.M. 30 °C)

* M.P. – meio com peptona; M.M. – Meio Mínimo suplementado com levedura

4.4. Estudo da adsorção

Nos processos biológicos de tratamento de efluentes as células bacterianas crescem fixadas a um suporte (biomassa fixa) ou encontram-se suspensas no meio (biomassa suspensa) (Metcalf e Eddy, 2003). Os processos que utilizam a biomassa fixa apresentam várias vantagens quando comparados com os processos de biomassa suspensa: formação de elevadas densidades de biomassa; diminuição dos tempos de retenção; permitem a co-existência da actividade metabólica aeróbia e anóxica dentro do mesmo ecossistema; menor sensibilidade aos efeitos de toxicidade e outras condições ambientais (Loukidou e Zouboulis, 2001). Por estas razões, o uso de suportes é particularmente útil em sistemas biológicos de tratamento de efluentes. O tamanho do suporte pode constituir uma limitação nestes sistemas de tratamento e por isso têm sido desenvolvidos processos que usam partículas pequenas ($<0,5\text{mm}$) com uma área de superfície muito grande ($1000\text{ m}^2\text{m}^{-3}$ por volume do reactor) (Cattaneo et al, 2003; Metcalf e Eddy, 2003).

Os sistemas de tratamento de efluentes utilizam diferentes tipos de suportes: peças em PVC, fragmentos em vidro ou leca, que influenciam a taxa de adsorção e o crescimento bacteriano. A textura da superfície e a porosidade dos suportes têm um impacto significativo na eficiência do filtro anaeróbio. Show e Tay (1999) demonstraram que um reactor com suportes com elevada porosidade apresenta uma grande taxa de adsorção, por oposição aos suportes com uma textura lisa que são menos eficientes.

Como já foi referido anteriormente, a estirpe T2 foi isolada do biofiltro de uma piscicultura marinha a partir de uma matriz de argila expandida (leca). Por este motivo, testou-se esta matriz neste estudo sob a forma de pequenas esferas ($\varnothing = 2-3\text{ mm}$). Para além desta, utilizou-se o carvão activado granular (GAC, $\varnothing = 2-3\text{ mm}$) que é de pequenas dimensões, mas apresenta uma grande área de superfície disponível para um crescimento biológico efectivo. O GAC combina os processos físico-químicos e os biológicos, numa só operação. Como é altamente poroso proporciona uma superfície apropriada para a adsorção da matéria orgânica e de alguns elementos. Este tipo de suporte optimiza as condições para o estabelecimento de processos de biodegradação efectiva de poluentes (Loukidou e Zouboulis, 2001). Estudou-se, ainda, um suporte em

acrílico com forma de anéis com uma relação área de superfície-volume inferior às outras duas ($\varnothing = 10$ mm).

Esperava-se que a adsorção da bactéria à leca fosse mais eficiente do que no suporte deste tipo porque a estirpe T2 tinha sido inicialmente isolada de um suporte de leca e, ao mesmo tempo, porque a leca é uma matriz muito porosa, apresentando uma área de superfície superior à do acrílico. Contudo, tal não se verificou talvez devido às diferenças nas condições experimentais. No estudo aqui realizado, observou-se ainda, que no controlo, onde não havia suporte, houve uma redução significativa da biomassa no sobrenadante. Este resultado não era totalmente imprevisível porque os ensaios de adsorção foram realizados em frascos de vidro. O vidro é um material utilizado com frequência como suporte em sistemas de tratamento de biomassa fixa, pois como demonstraram Van Schie e Fletcher (1999) existem muitas espécies bacterianas que apresentam uma grande taxa de adsorção a este material. Provavelmente uma grande parte das bactérias do controlo aderiu às paredes de vidro dos frascos. É ainda de considerar a hipótese de ter havido perda de viabilidade da cultura bacteriana.

O carvão activado granular foi o suporte estudado que apresentou uma menor concentração de biomassa no sobrenadante e um maior número de U.F.C./g adsorvido no suporte, o que indica que a adsorção a este material foi mais bem sucedida.

5. Considerações finais

A bactéria estudada pertence ao grupo das bactérias fluorescentes do género *Pseudomonas*. De acordo com a sequenciação do DNA 16S rRNA encontra-se muito próxima filogeneticamente da *P. gessardii*, *P. libanensis*, *P. synxantha*, *P. reactans*, e *P. fluorescens*.

A bactéria T2 tem um metabolismo anaeróbio facultativo, utilizando o NO_3^- como receptor de electrões na ausência de oxigénio. A salinidade de 2,8 % parece influenciar negativamente o crescimento da bactéria. No entanto, o crescimento com NaCl foi considerável, como indicam as taxas de crescimento entre 0,12 a 0,28 h^{-1} , em condições aeróbias e 0,1 h^{-1} em anoxia.

Quanto às fontes de carbono testadas em anoxia obtiveram-se, para uma razão C/N=1.0, dois grupos, de acordo com os resultados de crescimento obtidos: (1) o extracto de levedura que apresentou os melhores resultados com 86 mg/L de biomassa formada; (2) a glucose, o acetato e o metanol que atingiram uma biomassa de cerca 60 mg/L. Para uma razão C/N=2.0 os resultados apontam para 3 grupos: (1) o extracto de levedura que serviu apenas de referência e demonstrou mais uma vez ser uma boa fonte de carbono; (2) a glucose e o acetato que atingiram os 100 mg/L; (3) o metanol que nesta razão C/N não promoveu o crescimento. Por isso, talvez fosse pertinente experimentar para o metanol uma razão C/N de 1.5.

Os valores observados na avaliação da cinética da desnitrificação enquadram-se nos valores referidos na literatura. Nos ensaios realizados com uma concentração de N-NO_3^- de 300 mg/L ocorreu uma acumulação de nitritos temporária e as taxas de redução de nitratos e nitritos são inferiores às que aconteceram num meio com 40 mg/L de N-NO_3^- . As condições do inóculo demonstraram serem importantes na eficiência deste processo, ou seja quando a pré cultura é preparada em presença de oxigénio e na ausência de nitratos a desnitrificação demora mais tempo para se iniciar.

A bactéria T2 removeu totalmente o nitrato sem acumulação de nitritos nas duas situações, em condições de 2,8 % de salinidade, o que abre boas perspectivas para a sua aplicação a situações de tratamento de efluentes salinos.

Dos suportes testados o carvão activado granular demonstrou ser aquele onde ocorria uma maior adsorção e por isso a sua utilização a sistemas de tratamento águas de piscicultura com biomassa fixa parece ser mais viável. O método do Cádmio Esponjoso desenvolvido por Jones (1984) mostrou-se fiável e preciso. O trabalho desenvolvido

demonstrou que: (1) se podem realizar diluições que podem ir até 1:1000; (2) se podem efectuar muitas análises em simultâneo (30 a 50 tubos) num curto espaço de tempo (2-3 horas); (3) pode usar-se um pequeno volume de amostra (5ml); (4) a resazurina utilizada nos ensaios de anaerobiose não afecta o método para diluições superiores a 1:5.

O trabalho aqui apresentado caracteriza e descreve uma espécie bacteriana desnitrificante. Seria interessante, em trabalhos futuros estudar outros aspectos da fisiologia deste microrganismo: (1) avaliar os produtos finais da desnitrificação, isto é, os gases formados (NO , N_2O e N_2), quer em termos qualitativos como quantitativos; (2) avaliar a capacidade de desnitrificação aeróbia; (3) testar outras fontes de carbono na desnitrificação; (4) verificar se a bactéria tem a capacidade de remoção simultânea do azoto e do fósforo.

6. Bibliografia

Aboutboul, Y., Arviv, R., van Rijn, J. (1995). Anaerobic treatment of intensive fish culture effluents: volatile fatty acid mediated denitrification. *Aquaculture*, 133: 21-32.

Aminot, A., Chaussepied, M. (1983). *Manuel des Analyses Chimiques en Milieu Marin*. CNEXO, Brest. 394 pp.

Bastos, F., Bessa, J., Pacheco, C.C., De Marco, P., Castro, P.M.L. (2002). Enrichment of microbial cultures able to degrade 1,3-dichloro-2-propanol: A comparison between batch and continuous methods. *Biodegradation* 13: 211-220.

Bilanovic, D., Battistoni, P., Cecchi, F., Pavan, P., Mata-Alvarez, J. (1999). Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. *Water Research*, 33 (15): 3311-3320.

Blancheton, J.P. (2000). Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. *Aquacultural Engineering*, 22: 17-31.

Borges, M.T., Morais, A., Castro, P.M.L. (2003). Performance of outdoor seawater treatment systems for recirculation in an intensive turbot (*Scophthalmus maximus*) farm. *Aquaculture International*, 11: 557-570.

Cattaneo, C., Nicolella, C., Rovatti, M. (2003). Denitrification performance of *Pseudomonas denitrificans* in a Fluidized-Bed Biofilm Reactor and in a Stirred Tank Reactor. *Engineering Life Science*, 3 (4): 187-192.

Constantin, H., Fick, M. (1997). Influence of C-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Research*, 31 (3): 583-589.

Dabboussi, F., Hamze, M., Elomari, M., Verhille, S., Baida, N., Izard, D., Leclerc, H. (1999). *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from Lebanese spring waters. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1091-1101.

Diário da República (1997). Decreto Lei 152/97, 19 de Junho. Governo da República Portuguesa.

Diário da República (1998). Decreto Lei 236/98 de 1 de Agosto. Governo da República Portuguesa.

Dinçer, A.R., Kargi, F. (2000). Kinetics of sequential nitrification and denitrification processes. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 37-42.

Drysdale, G.D., Kusan, H.C., Bux, F. (1999). Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. *Water SA*, 25 (3):357-362.

Eckenfelder, W. W., Jr. (1989). *Industrial Water Pollution Control*. 2nd Ed. McGraw – Hill Internat. Ed. Civil Engineering Series. 400 pp.

Felsenstein, J. (1995). Phylogeny Inference Package, version 3.57c. University of Washington, Seattle, USA.

Ferreira, W.F.C., Sousa, J.C.F. (1998) *Microbiologia*, Volume 1. Lidel – Edições Técnicas, 342 pp.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W. A., Krieg, N. R. (1994) *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 791 pp.

Glass, C., Silverstein, J. (1998). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research*, 32 (3): 831-839.

Glass, C., Silverstein, J. (1999). Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Research*, 33 (1): 223-229.

Godfrey, S.A.C., Harrow, S.A., Marshall, J.W., Klena, J.D. (2001) Characterization by 16S rRNA sequence analysis of Pseudomonads causing blotch disease of cultivated *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (9): 4316-4323.

Gomez, M. A., Hontoria, E., González-López, J. (2002). Effect of dissolved oxygen concentration on nitrate removal from groundwater using a denitrifying submerged filter. *Journal of Hazardous Materials*, 90: 267-278.

Gouw, M., Bozic, R., Koopman, B., Svoronos, S. A. (2001). Effect of nitrate exposure history on the oxygen/nitrate diauxic growth of *Pseudomonas denitrificans*. *Water Research*, 35 (11): 2794-2798.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41:95-98.

Hallin, S. E, Pell, M. (1998). Metabolic properties of denitrifying bacteria adapting to methanol and ethanol in activated sludge. *Water Research*, 32 (1): 13-18.

Jobbágy, A. Simon, J., Plóz, B. (2000). The impact of oxygen penetration on the estimation of denitrification rates in anoxic processes. *Water Research*, 34 (9): 2606-2609.

Johnsen, K., Andersen, S., Jacobsen, C. S., (1996). Phenotypic and Genotypic Characterization of Phenanthrene-degrading Fluorescent *Pseudomonas* Biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (10): 3818-3825.

Jones, M. N. (1984). Nitrate reduction by shaking with cadmium. Alternative to cadmium columns. *Water Research*, 18 (5): 643-646.

Kariminiaae-Hamedani, H., Kanda, Kato, F. (2004). Denitrification activity of the bacterium *Pseudomonas* sp. ASM-2-3 isolated from the Ariake Sea Tideland. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97 (1): 39-44.

Kornaros, M., Lyberatos, G. (1997). Kinetics of aerobic growth of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas denitrificans*, in the presence of nitrates and/or nitrites. *Water Research*, 31 (3): 479-488.

Kornaros, M., Lyberatos, G. (1998). Kinetic modelling of *Pseudomonas denitrificans* growth and denitrification under aerobic, anoxic and transient operating conditions. *Water Research*, 32 (6): 1912-1922.

Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds) (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Baltimore, Md: Williams and Wilkins, 964 pp.

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackbrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.) Chichester, John Wiley and Sons, UK, pp. 115-175.

Lee, N.M., Welander, T. (1996). The effect of different carbon sources on respiratory denitrification in biological wastewater treatment. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (3): 277-285.

Lee, P.G., Lea, R.N., Dohmann, E., Prebilsky, W., Turk, P.E., Ying, H., Whitson, J.L. (2000). Denitrification in aquaculture systems: an example of fuzzy logic control problem. *Aquacultural Engineering*, 23: 37-59.

Leonard, N., Blancheton, J.P., Guiraud, J.P. (2000). Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering*, 22: 109-120.

Leonard, N., Guiraud, J.P., Gasset, E., Cailleres, J.P., Blancheton (2002). Bacteria and nutrients – nitrogen and carbon – in a recirculating system for sea bass production. *Aquacultural Engineering*, 26: 111-127.

Liu, P., Svoronos, S. A., Koopman, B. (1998). Experimental and modelling study of diauxic lag of *Pseudomonas denitrificans* switching from oxic to anoxic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 60 (6): 649-655.

Loukidou, M.X., Zouboulis, A.I. (2001). Comparison of two biological treatment processes using attached-growth biomass for sanitary landfill leachate treatment. *Environmental Pollution*, 111: 273-281.

Marazioti, C., Kornaros, M., Lyberatos, G. (2003). Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions. *Water Research*, 37: 1239-1251.

Martienssen, M., Schops, R. (1997). Biological Treatment of leachate from solid waste landfill sites – alterations in the bacterial community during the denitrification process. *Water Research*, 31 (5): 1164-1170.

Menasveta, P., Panritdam, T., Sihanonth, P., Powtongsook, S., Chuntapa, B., Lee, P. (2001). Design and function of a closed, recirculating seawater system with denitrification for the culture of black tiger shrimp broodstock. *Aquacultural Engineering*, 25: 35-49.

Metcalf e Eddy (2003). *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse*, 4^o Edition. McGraw-Hill, Inc., U.S.A., 1819 pp.

Munsch, P., Geoffroy, V.A., Alatossava, T., Meyer, J.-M. (2000). Application of siderotyping characterization of “*Pseudomonas tolaasii*” and “*Pseudomonas reactans*” isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (11): 4834-4841.

Nurse, G.R., (1980). Denitrification with metanol: microbiology and biochemistry. *Water Research*, 14: 531-537.

OECD/GD(1997)22. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 6. Consensus document on information used in the assessment of environmental applications involving *Pseudomonas*. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris, www.oecd.org

Panswad, T., Anan, C. (1999). Specific oxygen, ammonia, and nitrate uptake rates of a biological nutrient removal process treating elevated salinity wastewater. *Bioresource Technology*, 70: 237-243.

Park, E., Seo, J., Kim, M., Jung, I., Kim J., Kim S. (2001). Salinity acclimation of immobilized freshwater denitrifier. *Aquacultural Engineering*, 24: 169-180.

Pelczar M. J. Jr., Chan E. C. S., Kreig N. R. (1993). *Microbiology – Concepts and Applications*. McGraw-Hill, Inc., U.S.A., 896 pp.

Pinar, G., Kovarova, K., Egli, T., Ramos, J. (1998). Influence of carbon source on nitrate removal by nitrate-tolerant *Klebsiella oxytoca* CECT 4460 in Batch and Chemostat Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (8): 2970-2976.

Pirtillä, A.M., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllylä, R., Hohtola, A.(2000). Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (7): 3073-3077.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2002). *Microbiology*, 5th ed. McGraw-Hill, Inc., U.S.A., 1026 pp.

Reay, D. S., Nedwell, D. B., Priddle, J., Ellis-Evans, J. C. (1999). Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (6): 2577-2584.

Rhee, S.-K., Lee, G.M., Yoon, J.-H. Park, Y.-H, Bae, H.-S., Lee, S.-T. (1997). Anaerobic and Aerobic Degradation of Pyridine by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (7): 2578-2585.

Sauthier, N., Grasmick, A., Blancheton, J.P. (1998). Biological denitrification applied to a marine closed aquaculture system. *Water Research*, 32: 1932-1938.

Show, K.-Y., Tay, J.-H. (1999). Influence of support media on biomass growth and retention in anaerobic filters. *Water Research*, 33 (6): 1471-1481.

Smibert, R.M., Krieg, N.R. (1981). General characterization. In: Manual of methods for general bacteriology (Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W. A., Krieg, N. R. And Briggs, P.G. Eds.), pp. 409-443. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.

Tal, Y., Watts, J.E.M., Schreier, S.B., Sowers, K.R., Schreier, H.J. (2003). Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed reactors in closed recirculated mariculture system. *Aquaculture*, 215: 187-202.

Timmermans, P., Van Haute, A. (1983). Denitrification with metanol. Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp. *Water Research*, 17 (10): 1249-1255.

Tryfinopoulos, P., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J.E. (2002). Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (1):65-72.

Van Rijn, J. (1996). The potencial for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture – A review. *Aquaculture*, 139: 181-201

Van Rijn, J., Tal, Y., Barak, Y. (1996). Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (7): 2615-2620.

Van Schie, P.M., Fletcher, M. (1999). Adhesion of biodegradative anaerobic bacteria to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (11): 5082-5088.

Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Hamze, M., Izard, D., Leclerc, H. (1999). *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species from natural mineral waters. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 4: 1559-1572.

Wasik, E., Bohdziewicz, J., Blaszczyk, M. (2001). Removal of nitrates from ground water by a hybrid process of biological denitrification and microfiltration membrane. *Process Biochemistry*, 37: 57-64.

Wisniewski, C., Persin, F., Cherif, T., Sandeaux, R., Grasmick, A., Gavach, C. (2001). Denitrification of drinking water by association of electrodialysis process and membrane bioreactor: feasibility and application. *Desalination*, 139: 199-205.

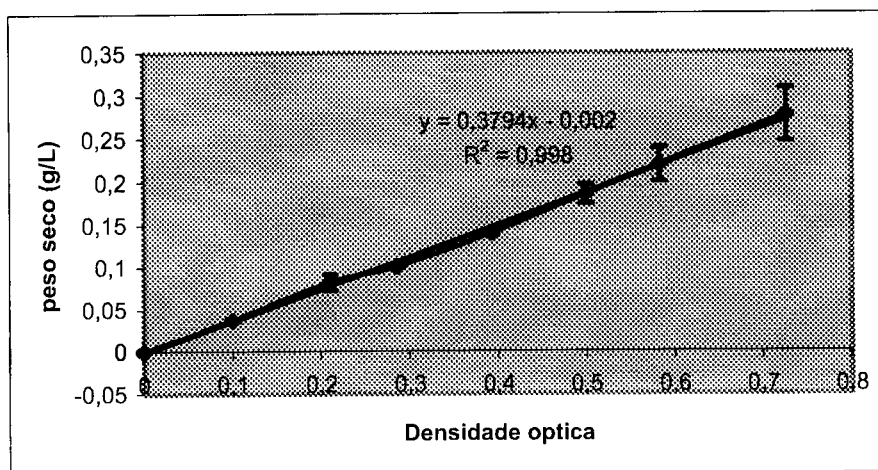
Yang, P.Y., Nitisoravut, S., Wu, J. (1995). Nitrate removal using a mixed-culture entrapped microbial cell immobilization process under high salt conditions. *Water Research*, 29: 1525-1532.

ANEXOS

7 – Anexos

Anexo 1 – Exemplo de recta de calibração para determinação da biomassa

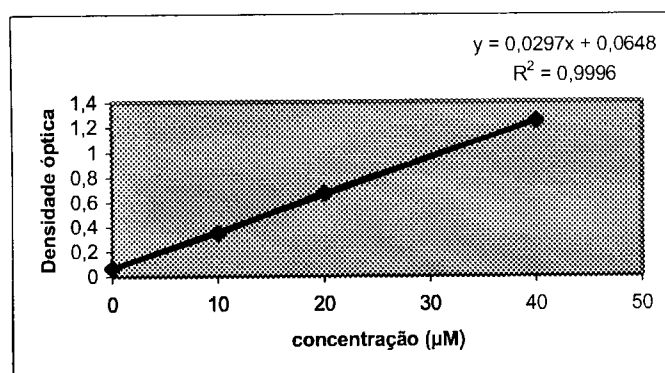
Para a elaboração da recta de regressão linear para determinação da biomassa bacteriana realizaram-se diluições de uma cultura densa de modo a serem obtidas as seguintes densidades ópticas: 0 – 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 – 0,5 – 0,6 e 0,7. Neste exemplo, o valor de R^2 obtido foi de 0,998, sendo a equação da recta: $y=0,3794x - 0,002$, com y = peso seco (g) e x =densidade óptica (600 nm).



Anexo 2 – Exemplo de rectas de calibração para doseamento de nitratos e de nitritos

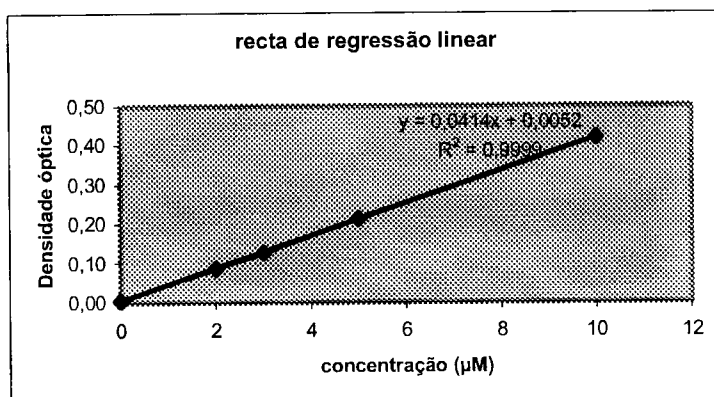
• Nitratos

A recta de regressão linear apresentada é um exemplo de uma das rectas obtidas sempre que se realizava o doseamento de nitratos. Para a elaboração das curvas de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações: 0 – 10 – 20 – 30 e 40 $\mu\text{moles/L}$ (Jones 1984). Neste exemplo, o valor de R^2 obtido foi de 0,996, sendo a equação de recta: $y=0,0297x + 0,0648$, com y =densidade óptica (540 nm) e x =concentração de N-NO_3^- (μM)



• Nitritos

A recta de regressão linear apresentada é um exemplo de uma das rectas obtidas sempre que se realizava o doseamento de nitritos. Para a elaboração das rectas de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações: 0 – 2 – 3 – 5 e 10 $\mu\text{moles/L}$ (Jones, 1984). Neste exemplo, o valor de R^2 obtido foi de 0,999, sendo a equação de recta: $y=0,0414x + 0,0052$, com y =densidade óptica (540 nm) e x =concentração de N-NO_2^- (μM).



Anexo 3 – Sequências do gene 16S rRNA da bactéria T2 e das estirpes bacterianas mais próximas de acordo com a análise filogenética efectuada

LOCUS bankit688440 1457 bp DNA linear BCT 03-JAN-2005

DEFINITION 16S rDNA, partial.

ACCESSION ;

KEYWORDS .

SOURCE Pseudomonas sp.

ORGANISM Pseudomonas sp.
Bacteria; Proteobacteria.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1457)

AUTHORS Sousa,A.

TITLE Isolation and characterization of a denitrifying fluorescent Pseudomonas

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1457)

AUTHORS De Marco,P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-JAN-2005) MCA, IBMC, R. Campo Alegre, 823, Oporto 4150-180, Portugal

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1457
/organism="Pseudomonas sp."
/strain="T2"
/db_xref="taxon:306"

BASE COUNT 370 a 323 c 456 g 308 t

ORIGIN

```

1 attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc ggtagagaga agcttgcttc
61 tcttgagagc ggcggcaggc tgagtaatgc ctagggaatct gcctggtagt gggggataac
121 gttcggaaac ggacgctaata accgcatacg tcctacggga gaaagcaggg gaccttcggg
181 ccttgcgcta tcagatgagc ctaggtcgga ttagctagtt ggtggggtaa tggctcacca
241 aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga tgatcagtc cactggaact gagacacggt
301 ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgaaa gcctgatcca
361 gccatgccgc gtgtgtgaag aagtcttcga ttgtaaagca ctttaagttg ggaggaaggg
421 ttgtagatta atactctgca attttgacgt taccgacaga ataagcacgg gctaactctg
481 tgccagcagc cgcggtaata cagaggggtg aagcgttaat cggaattact gggcgtaaa
541 cgcgcgtagg tggtagtta agttggatgt gaaatccccg ggctcaacct gggaactgca
601 ttcaaaactg actgactaga gtatggtaga ggggtggtga atttcctgtg tagcggtgaa
661 atgcgtagat ataggaagga acaccagtgg cgaaggcgac cacctggact gatactgaca
721 ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgcgtaa
781 acgatgtcaa ctagccgttg ggagccttga gctcttagtg gcgcagctaa cgcattaagt
841 tgaccgcctg gggagtacgg ccgcaagggt aaaactcaaa tgaattgacg ggggcccgca
901 caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggccttgac
961 atccaatgaa ctttctagag atagattggt gccttcggga acattgagag aggtgctgca
1021 tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgtaacga gcgcaacct
1081 tgtccttagt taccagcacg taatgggtgg cactctaagg agactgccgg tgacaaaccg
1141 gaggaagggt gggatgacgt caagtcatca tggcccttac ggctggggt acacacgtgc
1201 tacaatggtc ggtacagagg gttgccaaagc cgcgaggtgg agctaattcc acaaaaccga
1261 tcgtagtcog gatcgagtc tgcaactcga ctgcgtgaag tcggaatcgc tagtaatcgc
1321 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcacaccat
1381 gggagtgggt tgcaccagaa gtagctagtc taaccttcgg gaggacggtt accacgggtg
1441 gattcatgac tgggggtg

```

//

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,
or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Posted date: Apr 1, 2003 11:54 PM

LOCUS AF267911 1500 bp DNA linear BCT 01-AUG-2000

DEFINITION *Pseudomonas synxantha* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION AF267911

VERSION AF267911.1 GI:9623379

KEYWORDS

SOURCE *Pseudomonas synxantha*

ORGANISM *Pseudomonas synxantha*

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1500)

AUTHORS Pirttilä, A.M., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllylä, R. and Hohtola, A.

TITLE Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine
(*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization

JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 66 (7), 3073-3077 (2000)

MEDLINE 20336462

PUBMED 10877808

REFERENCE 2 (bases 1 to 1500)

AUTHORS Pirttilä, A.M., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllylä, R. and Hohtola, A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-MAY-2000) Department of Biology/Botany, University of
Oulu, POB 3000, Oulu FIN-90014, Finland

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1500
/organism="Pseudomonas synxantha"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="DSM 13080"
/isolate="G"
/db_xref="taxon:47883"
rRNA <1..>1500
/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 agagtttgat cttggctcag attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg
caagtcgagc
61 ggtagagaga agcttgcttc tcttgagagc ggcgacggg tgagtaatgc
ctaggaatct
121 gcctggtagt gggggataac gttcggaac ggacgctaata accgcatacg
tcctacggga
181 gaaagcaggg gaccttcggg cttgctgcta tcagatgagc ctaggtcgga
ttagctagtt
241 ggtgaggtaa tggctacca aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga
tgatcagtea
301 cactggaact gagacacggt ccagactcct acgggaggca gcagtgggga
atattggaca
361 atgggcgaaa gcctgatcca gccatgccgc gtgtgtgaag aaggctcttcg
gattgtaaag
421 cactttaagt tgggaggaag ggtttagat taatactctg caattttgac
gttaccgaca
481 gaataagcac cggctaactc tgtgccagca gccgcggtaa tacagagggt
gcaagcgtaa
541 atcgaatta ctgggcgtaa agcgcgcgta ggtggtttgt taagttggat
gtgaaatccc
601 cgggctcaac ctgggaactg cattcaaaac tgactgacta gagtatggta
gagggtggtg
661 gaatttcctg tgtagcgggt aaatgcgtag atataggaag gaacaccagt
ggcgaaggcg
721 accacctgga ctaatactga cactgaggtg cgaaagcgtg gggagcaaac
aggattagat
```

781 accctggtag tccacgccgt aaacgatgtc aactagccgt tggaagcctt
gagcttttag
841 tggcgagct aacgcattaa gttgaccgcc tggggagtag ggccgcaagg
ttaaaactca
901 aatgaattga cgggggcccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg
aagcaacgag
961 aagaacctta ccaggccttg acatccaatg aactttctag agatagattg
gtgccttcgg
1021 gaacattgag acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat
gttgggttaa
1081 gtcccgtaac gagcgcaacc cttgtcctta gttaccagca cgtaatggtg
ggcactctaa
1141 ggagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tgggatgac gtcaagtcac
catggccctt
1201 acggcctggg ctacacacgt gctacaatgg tcggtacaga ggggtgcaa
gccgcgaggt
1261 ggagctaata ccataaaacc gatcgtagtc cggatcgag tctgcaactc
gactgcgtga
1321 agtcggaatc gctagtaatc gcgaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc
ccgggccttg
1381 tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtg gttgcaccag aagtagctag
tetaaccttc
1441 gggaggacgg ttaccacggg gtgattcatg actggggtga agtcgtaaca
aggtagccgt

LOCUS AF074384 1516 bp DNA linear BCT 17-NOV-1999
 DEFINITION *Pseudomonas gessardii* 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.
 ACCESSION AF074384
 VERSION AF074384.1 GI:3309635

KEYWORDS

SOURCE *Pseudomonas gessardii*

ORGANISM *Pseudomonas gessardii*

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;

Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1516)

AUTHORS Verhille,S., Baida,N., Dabboussi,F., Hamze,M., Izard,D. and
 Leclerc,H.

TITLE *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov.,
 two new species isolated from natural mineral waters

JOURNAL Int. J. Syst. Bacteriol. 49 Pt 4, 1559-1572 (1999)

MEDLINE 20023037

PUBMED 10555337

REFERENCE 2 (bases 1 to 1516)

AUTHORS Verhille,S., Dabboussi,F., Baida,N., Izard,D. and Leclerc,H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-JUN-1998) Laboratory of Bacteriology, Medical
 University, 1, place de Verdun, Lille 59045, France

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1516

/organism="Pseudomonas gessardii"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="CIP 105469"

/db_xref="taxon:78544"

/note="isolated from French mineral waters"

rRNA 1..1516

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 gatcctggct cagattgaac gctggcggca ggctaacac atgcaagtcg
agcggtagag
61 agaagcttgc ttctcttgag agcggcggac gggtagtaa tgcctaggaa
tctgcctggt
121 agtgggggat aacgttcgga aacggacgct aataccgat acgtcctacg
ggagaaaagca
181 ggggaccttc gggccttgcg ctatcagatg agcctaggtc ggattagcta
gttggtgggg
241 taatggctca ccaaggcgac gatccgtaac tggcttgaga ggatgatcag
tcacactgga
301 actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgg
acaatgggag
361 aaagcctgat ccagccatgc cgcgtgtgtg aagaaggctt tcggattgta
aagcacttta
421 agttgggagg aagggttgta gattaatact ctgcaatttt gacgttaccg
acagaataag
481 caccggctaa ctctgtgcca gcagccgcg taatacacag ggtgcaagcg
ttaatcggaa
541 ttactgggag taaagcgcg gtaggtggtt agttaagttg gatgtgaaat
ccccgggctc
601 aacctgggaa ctgcattcaa aactgactga ctagagtatg gtagaggggtg
gtggaatttc
661 ctgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatagg aaggaacacc agtggcgaag
gcgaccacct
721 ggactgatac tgacactgag gtgcgaaagc gtggggagca aacaggatta
gataccctgg
781 tagtccacgc cgtaaacgat gtcaactagc cgttgggagc cttgagctct
tagtggcgca
```

841 gctaacgcat taagttgacc gcctggggag tacggccgca aggttaaaac
tcaaataaat
901 tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaac tcgaagcaac
gcgaagaacc
961 ttaccaggcc ttgacatcca atgaactttc tagagataga ttggtgcctt
cgggaacatt
1021 gagacagggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt
taagtcccg
1081 aacgagcgca acccttgctc ttagttacca gcacgttatg gtgggcactc
taaggagact
1141 gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt catcatggcc
cttacggcct
1201 gggctacaca cgtgctacaa tggtcggtac agagggttgc caagccgga
ggtggagcta
1261 atccanaaa accgatcgta gtccggatcg cagtctgcaa ctgactgcg
tgaagtcgga
1321 atcgctagta atcggaatc agaatgtcgc ggtgaatacg ttccggggc
ttgtacacac
1381 cgcccgtcac accatgggag tgggttgac cagaagtagc tagtctaacc
ttcgggagga
1441 cggttaccac ggtgtgattc atgactggg tgaagtcgta acaaggtagc
cgtaggggaa
1501 cctgcggctg gatcac

LOCUS AF057645 1516 bp DNA linear BCT 28-JUL-1999
 DEFINITION *Pseudomonas libanensis* 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.
 ACCESSION AF057645
 VERSION AF057645.1 GI:3047379
 KEYWORDS .

SOURCE *Pseudomonas libanensis*
 ORGANISM *Pseudomonas libanensis*
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
 Pseudomonadaceae; Pseudomonas.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1516)
 AUTHORS Dabboussi,F., Hamze,M., Elomari,M., Verhille,S., Baida,N., Izard,D.
 and Leclerc,H.

TITLE *Pseudomonas libanensis* sp. nov., a new species isolated from
 Lebanese spring waters

JOURNAL Int. J. Syst. Bacteriol. 49 Pt 3, 1091-1101 (1999)

MEDLINE 99354498

PUBMED 10425766

REFERENCE 2 (bases 1 to 1516)
 AUTHORS Dabboussi,F., Hamze,M., Verhille,S., Baida,N., Izard,D. and
 Leclerc,H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-APR-1998) Bacteriological Laboratory, Medical
 University, 1 place de Verdun, Lille 59045, France

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1516
 /organism="Pseudomonas libanensis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="CIP 105460"
 /db_xref="taxon:75588"
 /note="isolated from Lebanese spring waters"

rRNA 1..1516
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 gatcctggct cagattgaac gctggcggca ggcctaacac atgcaagtgc
agcggtagag
61 agaagcttgc ttctcttgag agcggcggac gggtagtaa tgcctaggaa
tctgcctggt
121 agtgggggat aacgttcgga aacggacgct aataccgcat acgtcctacg
ggagaaaagca
181 ggggaccttc gggccttgcg ctatcagatg agcctaggtc ggattagcta
gttggtgggg
241 taatggctca ccaaggcgac gatccgtaac tggctcgaga ggatgatcag
tcacactgga
301 actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgg
acaatgggcg
361 aaagcctgat ccagccatgc cgcgtgtgtg aagaaggtct tcggattgta
aagcacttta
421 agttgggagg aagggttgta gattaatact ctgcaatttt gacgttaccg
acagaataag
481 caccggctaa ctctgtgccg gcagccgcgg taatacagag ggtgcaagcg
ttaatcgga
541 ttactgggcg taaagcgcg gtaggtggtt tgtaagtgtg gatgtgaaat
ccccgggctc
601 aacctgggaa ctgcattcaa aactgactga ctagagtatg gtagaggggtg
gtggaatttc
661 ctgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatagg aaggaacacc agtggcgaa
gcgaccacct
721 ggactgatac tgacactgag gtgcgaaagc gtggggagca aacaggatta
gataccctgg
```

781 tagtccacgc cgtaaacgat gtcaactagc cgttgggagc cttgagctct
tagtggcgca
841 gctaacgcat taagttgacc gectggggag tacggccgca aggttaaaac
tcaaataaat
901 tgacgggggc cgcacaagc ggtggagcat gtggtttaac tgaagcaac
gcgaagaacc
961 ttaccaggcc ttgacatcca atgaactttc tagagataga ttggtgcctt
cggaacatt
1021 gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt
taagtcccg
1081 aacgagcgca acccttgtcc ttagttacca gcacgtcatg gtgggcactc
taaggagact
1141 gccggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt catcatggcc
cttacggcct
1201 gggctacaca cgtgctacaa tggtcggtac agaggggtgc caagccgca
ggtggagcta
1261 atcccagaaa accgatcgta gtccggatcg cagtctgcaa ctcgactgcg
tgaagtcgga
1321 atcgctagta atcgcgaaac agaattgtgc ggtgaatacg ttcccgggcc
ttgtacacac
1381 cgcccgtcac accatgggag tgggttgac cagaagtagc tagtctaacc
ttcgggagga
1441 cggttaccac ggtgtgattc atgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc
cgtaggggaa
1501 cctgcggctg gatcac

LOCUS AF094729 1355 bp DNA linear BCT 04-OCT-2000
 DEFINITION *Pseudomonas fluorescens* strain ATCC 17556 16S ribosomal RNA gene,
 partial sequence.
 ACCESSION AF094729
 VERSION AF094729.1 GI:10567500
 KEYWORDS .
 SOURCE *Pseudomonas fluorescens*
 ORGANISM *Pseudomonas fluorescens*
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
 Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1355)
 AUTHORS Galdzicka,M., Plassmeyer,M.L., Blaine,L.D., Pienta,P.A. and
 Gillevet,P.M.
 TITLE Comparison of Phenetic and Phylogenetic Classification Systems for
 the Fluorescent *Pseudomonads*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1355)
 AUTHORS Galdzicka,M., Plassmeyer,M.L., Blaine,L.D., Pienta,P.A. and
 Gillevet,P.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-SEP-1998) Microbial Authentication Resource, American
 Type Culture Collection, 10801 University Blvd, Manassas, VA
 20110-2209, USA
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1355
 /organism="Pseudomonas fluorescens"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="ATCC 17556"
 /db_xref="ATCC:17556"
 /db_xref="taxon:294"
 rRNA <1..>1355
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 tgctcagatt gaacgctggc ggcaggccta acacatgcaa gtcgagcggc
 agagagaagc
 61 ttgcttctct tgagagcggc ggacgggtga gtaatgccta ggaatctgcc
 tggtagtggg
 121 ggataacggt cggaacgga cgctaatacc gcatacgtec tacgggagaa
 agcaggggac
 181 cttcgggcct tgcgctatca gatgagccta ggtcggatta gctagtgtgt
 gaggtaatgg
 241 ctcaccaagg cgacgatccg taactggtct gagaggatga tcagtcacac
 tgggaactgag
 301 acacgggtcca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttggacaatg
 ggcgaaagcc
 361 tgatccagcc atgccgcgtg tgtgaagaag gtcttcggat tgtaaagcac
 ttttaagtgg
 421 gaggaagggt tgtagattaa tactctgcaa ttttgacgtt accgacagaa
 taagcaccgg
 481 ctaactctgt gccagcagcc gcggtaatac agagggtgca agcggttaac
 ggaattactg
 541 ggcgtaaagc gcgcgtaggt ggtttgttaa gttggatgtg aaatccccgg
 gctcaacctg
 601 ggaactgcat tcaaaactga ctgactagag tatggtagag ggtggtggaa
 tttcctgtgt
 661 agcggtgaaa tgcgtagata taggaaggaa caccagtggc gaaggcgacc
 acctggacta
 721 atactgacac tgaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc
 ctggtagtcc

781 acgccgtaaa cgatgtcaac tagccgttgg aagccttgag cttttagtgg
cgcagctaac
841 gcattaagtt gaccgcctgg ggagtacggc cgcaagggtta aaactcaaat
gaattgacgg
901 gggcccgac aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag
aaccttacca
961 ggccttgaca tccaatgaac tttctagaga tagattggtg ctttcgggaa
cattgagaca
1021 ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatggt ggggttaagtc
ccgtaacgag
1081 cgcaaccctt gtcccttagtt accagcacgt catggtgggc actctaagga
gactgccggt
1141 gacaaaccgg aggaagggtg ggatgacgtc aagtcacat ggcccttacg
gcctgggcta
1201 cacacgtgct acaatggctg gtacagaggg ttgccaaagcc gcgaggtgga
gctaattcca
1261 taaaaccgat cgtagtcgg atcgagctct gcaactcgac tgcgtgaagt
cggaatcgct
1321 agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgt

LOCUS AF255337 1492 bp DNA linear BCT 17-DEC-2002
 DEFINITION *Pseudomonas reactans* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION AF255337
 VERSION AF255337.1 GI:7920706
 KEYWORDS .
 SOURCE *Pseudomonas reactans*
 ORGANISM *Pseudomonas reactans*
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
 Pseudomonadaceae; *Pseudomonas*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1492)
 AUTHORS Munsch,P., Alatosava,T., Martinen,N., Meyer,J.M., Christen,R. and Gardan,L.
 TITLE *Pseudomonas constantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (6), 1973-1983 (2002)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1492)
 AUTHORS Munsch,P. and Alatosava,T.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-APR-2000) REDEC of Kaajani, Biotechnology Laboratory, University of Oulu, Salmelantie 43, Sotkamo 88600, Finland
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1492
 /organism="Pseudomonas reactans"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="LMG 5329"
 /db_xref="taxon:117680"
 rRNA <1..>1492
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc ggtagagaga
 agcttgcttc
 61 tcttgagagc ggcggacggg tgagtaatgc ctaggaatct gcctggtagt
 gggggataaac
 121 gttcggaaac ggacgctaata accgcatacg tcctacggga gaaagcaggg
 gaccttcggg
 181 ccttgccgcta tcagatgagc ctaggtcgga ttagctagtt ggtgaggtaa
 tggctcacca
 241 aggcgacgat ccgtaactgg tctgagagga tgatcagtca cactggaact
 gagacacggt
 301 ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgaaa
 gcctgatcca
 361 gccatgccgc gtgtgtgaag aaggtcttcg gattgtaaag cactttaagt
 tgggaggaag
 421 ggttgtagat taatactctg caattttgac gttaccgaca gaataagcac
 cggctaactc
 481 tgtgccagca gccgcggtaa tacagagggt gcaagcgta atcggaatta
 ctgggcgtaa
 541 agcgcgcgta ggtggtttgt taagttggat gtgaaatccc cgggctcaac
 ctgggaactg
 601 cattcaaaac tgactgacta gagtatggtg gagggtggtg gaatttcctg
 tgtagcggtg
 661 aaatgcgtag atataggaag gaacaccagt ggcaaggcg accacctgga
 ctaatactga
 721 cactgaggtg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag
 tccacgccgt
 781 aaacgatgtc aactagccgt tggaagcctt gagcttttag tggcgagct
 aacgcattaa
 841 gttgaccgcc tggggagtag gccgcgaagg ttaaaactca aatgaattga
 cgggggccccg

901 cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgag aagaacctta
ccaggccttg
961 acatccaatg aactttctag agatagattg gtgccttcgg gaacattgag
acagggtgctg
1021 catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgtaac
gagcgcaacc
1081 cttgtcctta gttaccagca cgtcatgggtg ggcactctaa ggagactgcc
ggtgacaaac
1141 cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcac catggccctt acggcctggg
ctacacacgt
1201 gctacaatgg tcggtacaga gggttgcca ggcgcgaggt ggagctaata
ccataaaaacc
1261 gatcgtagtc cggatcgag tctgcaactc gactgcgtga agtcggaata
gctagtaata
1321 gcgaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc
ccgtcacacc
1381 atgggagtg gttgcaccag aagtagctag tctaaccctc gggaggacgg
ttaccacggt
1441 gtgattcatg actgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt aggggaacct gc
//