

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

**Estudo das comunidades bacterianas em
Filtros Biológicos Percoladores utilizados para
o pós-tratamento de efluentes de um reator
UASB**

Beatriz Missagia

Belo Horizonte
2010

**Estudo das comunidades bacterianas em Filtros
Biológicos Percoladores utilizados para o pós-tratamento
de efluentes de um reator UASB**

Beatriz Missagia

Beatriz Missagia

**Estudo das comunidades bacterianas em Filtros
Biológicos Percoladores utilizados para o pós-tratamento
de efluentes de um reator UASB**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de águas residuárias

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto de Lemos
Chernicharo (Universidade Federal de Minas Gerais)

Co-Orientadora: Prof. Dra. Silvana Queiroz Silva
(Universidade Federal de São João Del Rey)

Supervisor no Exterior: Prof. Dr. José Luis Sanz
(Universidad Autónoma de Madrid)

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG
2010

"A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão veemente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência."

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Chernicharo, pela oportunidade de realizar essa Tese e o Doutorado Sandwiche, pelos ensinamentos de Engenharia, pelo apoio indispensável na escrita de todos os documentos produzidos durante este trabalho e por confiar em meu trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Silvana Queiroz, que me acompanhou desde os “primeiros passos” nas técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao tratamento de águas residuárias, até a última etapa da execução desta Tese. Muito obrigada pelas valiosas correções e comentários, pela autonomia que me foi concedida ao longo destes quatro anos (indispensável para meu desenvolvimento científico) e pela disponibilidade em me apoiar em muitas decisões.

Ao Prof. Dr. José Luis Sanz, supervisor do meu Doutorado Sandwich na Universidad Autónoma de Madrid - UAM, pelos preciosos ensinamentos e por fazer da biologia molecular uma ferramenta simples e divertida. Agradeço também pelo exemplo de orientação, pela oportunidade de conviver, aprender e trabalhar com pessoas encantadoras em seu laboratório, pelo apoio em Madrid e suporte ao projeto. Suas palavras de ânimo e amizade foram essenciais para a realização desta etapa na Espanha. Obrigada por vir ao Brasil para esta Defesa.

Ao Almeida (2007; 2009) - Paulo Gustavo - agradeço por ter sido meu parceiro de equipe ao longo destes quatro anos e pelo apoio essencial nas coletas na ETE Arrudas. Seus ensinamentos de engenharia sanitária e operação de filtros biológicos percoladores, aliados ao seu interesse e empolgação pela microbiologia/biologia molecular resultaram em uma grande amizade.

A todos os companheiros do Laboratório de Microbiología Aplicada da UAM, em especial aos amigos Irene Sanchez, Nico Raho e Núria Fernández, pela amável acolhida dentro e fora do laboratório, pelas aulas, dicas, paciência, injeções de ânimo, por me acompanharem em todos os experimentos de biologia molecular, e principalmente pela forte amizade adquirida.

Ao Bernardo Ranieri, pelos ensinamentos e suporte indispensável nas análises estatísticas, pelo entusiasmo e tempo despendido neste trabalho.

Às colegas Érika, Valéria e Grazi, do Laboratório de Microbiologia do DESA, pela colaboração nas coletas e experimentos.

À Adriana Zerbini, bióloga do Laboratório de Microbiologia do DESA, pelo apoio nas análises de biologia molecular. Agradeço do fundo do meu coração pelas palavras de conforto, elogios e carinho durante todo o Doutorado.

À coordenação do Programa de Pós Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

À Iara (secretária do curso de Pós Graduação) pelo apoio indispensável.

À minha mãezinha Zuleica, meu pai Sebastião, irmã Bruna e sobrinha Lia Marie, amores de minha vida, pelo carinho, compreensão e apoio incondicional.

Às amigas do coração: Lia Teixeira, Gisely Paulino, Máira Buzelin, Patrícia Nogueira, Tate Lana, Márcia Shimabukuro, Carolina Azevedo, Kênia Faria, Ana Mourão, Dani Lages, Marina Gonçalves, Fernanda Antunes, Juliana Mol, Flávia Veronese e Irene Sanchez, grandes companheiras, por estarem ao meu lado na alegria e nos devaneios, na saúde e na doença, e que o destino nunca nos separe.

Aos grandes amigos biólogos que me acompanham nestes dez anos de UFMG, em especial Bruno Garcia, Fernando Marino e Glenito, pelos momentos sempre alegres e divertidos, essenciais para a vida ficar mais colorida. Em destaque, agradeço a todos os amigos do escritório do ICB, que me cederam um espaço, me apoiaram e mimaram durante a escrita da tese.

Ao CNPq e à CAPES, pelas bolsas concedidas durante o curso de Doutorado.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

O foco deste estudo foi investigar a influência das condições ambientais proporcionadas por diferentes tipos de materiais suporte (escória de alto-forno, anéis plásticos, *Downflow Hanging Sponge* e aparas de conduíte), profundidades distintas e duas diferentes cargas orgânicas volumétricas na abundância e distribuição de bactérias nitrificantes, na diversidade microbiana (domínio *Bacteria*), assim como no desempenho do reator (remoção de amônia), em quatro filtros biológicos percoladores (FBP) pós-reator UASB tratando esgoto doméstico. Microrganismos de diversas complexidades e funções foram visualizados, sendo que o topo dos FBP apresentou a maior diversidade de morfologias, devido à maior disponibilidade de matéria orgânica, luz solar e oxigênio nesta altura. O aumento significativo da quantidade de células de *Nitrobacter* foi detectado do meio para o fundo de todos os FBP, em ambas as fases de operação (COV de 0,24 e de 0,38 kgDBO/m³.d), em consonância com as elevadas concentrações de nitrato e baixas concentrações de DBO também verificadas nesta porção dos filtros. Contudo, as abundâncias de células de AOB e *Nitrospira* permaneceram constantes. As diferentes composições e configurações dos materiais suporte proporcionam condições ambientais distintas, conduzindo ao desenvolvimento de vários perfis diferentes de distribuição e abundâncias de *Bacteria*, AOB e NOB e *T. denitrificans*, sendo que o sistema DHS apresentou a maior abundância de todos os microrganismos investigados nas duas fases de operação. Os espaços intersticiais do DHS são ideais para a retenção da biomassa e também dos substratos disponíveis, resultando em condições ambientais muito favoráveis para a nitrificação. As contagens de *Bacteria* foram significativamente maiores na COV mais elevada (0,38 kgDBO/m³.d), enquanto houve um decréscimo significativo da quantidade de nitrificantes em todos os FBP. Tais aspectos estão de acordo com a baixa remoção de amônia observada na fase operacional com COV mais elevada. O aumento da COV promoveu o aparecimento de microambientes anóxicos e anaeróbios. Estas condições ambientais foram determinantes para o desenvolvimento de *Thiobacillus denitrificans* nos materiais suporte DHS e aparas de conduíte. Apesar de os reatores terem sido alimentados pelo mesmo efluente do reator UASB, as diferentes composições e configurações dos materiais de enchimento resultaram no desenvolvimento de diferentes condições ambientais, que favoreceram o estabelecimento diversificado de espécies. *Actinobacteria*, *Firmicutes* e o clone *UTFS-R12-90-53* (não-cultivada) foram identificadas em amostras de biofilme com mais de 98% de similaridade com seqüências depositadas no NCBI provenientes de sistemas DHS e de tratamento de esgoto doméstico aeróbio/anaeróbio.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the influence of environmental conditions provided by four different types of packing media, distinct depths and two different organic loading rates (OLR) on bacterial diversity, and abundance, distribution of nitrifying bacteria, as well as on reactor performance (ammonia removal) in four trickling filters following UASB reactors treating domestic wastewater. Microorganisms of various complexities and functions were viewed, and the top of the FBP showed the highest diversity of morphologies, due to the increased availability of organic matter, sunlight and oxygen at this point. The significant increase in the number of *Nitrobacter* cells were detected from the middle to bottom of all TF, in both phases of operation (OLR of 0.24 and 0.38 kgBOD/m³.d), in accordance with the high nitrate concentrations and low concentrations of BOD also found in this portion of the filters. However, the abundance of cells of AOB and *Nitrospira* remained constant. The different compositions and configurations of packing media provide different environmental conditions, leading to the development of different profiles of distribution and abundance of Bacteria, AOB and NOB and *Thiobacillus denitrificans*, and the DHS system showed the highest abundance of all organisms investigated in the two phases of operation. The interstitial spaces of the DHS are ideal for the biomass retention and also the available substrates, resulting in favourable environmental conditions to nitrification. *Bacteria* counts were significantly higher in the OLR of 0.38 kgBOD/m³.d., while there was a significant decrease in the nitrifying bacteria amount in all the TF. These aspects are consistent with the low ammonia removal observed in the operational phase with higher OLR. The increase in OLR promoted the appearance of anoxic and anaerobic microenvironments. These environmental conditions were decisive for the development of *T. denitrificans* in DHS and plastic tubing. Although the reactors were fed with the same effluent from the UASB reactor, the different compositions and configurations of the packing medias resulted in the development of different environmental conditions that lead to the development of diverse species. *Actinobacteria*, *Firmicutes* and the clone *UTFs-R12-90-53* (uncultivated) were identified in biofilm samples with more than 98% similarity with sequences deposited at NCBI from DHS systems and an aerobic / anaerobic domestic wastewater treatment.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	1
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	16
LISTA DE ABREVIATURAS	18
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 Sistema UASB-Filtro Biológico Percolador.....	23
3.2 Remoção biológica de nitrogênio	25
3.2.1 Nitrificação	26
3.2.1.1 Bactérias oxidadoras de amônia (AOB).....	29
3.2.1.2 Bactérias oxidadoras de nitrito (NOB).....	30
3.2.2 Desnitrificação.....	31
3.2.3 Novos processos utilizados na remoção de nitrogênio	32
3.3 Biofilmes.....	34
3.3.1 Formação e constituição de biofilmes	35
3.3.2 Composição da comunidade de biofilmes de FBPs.....	36
3.3.3 Competição entre os microrganismos envolvidos na formação dos biofilmes	38
3.4 Ecologia Microbiana	39
3.4.1 Breve histórico	39
3.4.2 Estudo da diversidade microbiana.....	41
3.4.3 Técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da ecologia microbiana.....	44
3.4.3.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	44
3.4.3.2 PCR-clonagem	45
3.4.3.3 PCR-DGGE.....	46
3.4.3.4 Hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH)	47
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 Descrição do Aparato Experimental	50
4.2 Coleta e preparo das amostras.....	52
4.3 Análises morfológicas.....	53
4.4 Análises de biologia molecular	53

4.4.1	Hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH)	53
4.4.2	Extração de DNA	55
4.4.3	Eletroforese em gel de agarose	55
4.4.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	55
4.4.5	Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE)	56
4.4.6	Biblioteca genômica (clonagem).....	57
4.4.7	Análise dos clones	58
4.5	<i>Análises estatísticas</i>	59
4.5.1	Abundância de microrganismos específicos	59
4.5.2	Similaridade, diversidade e construção de dendogramas	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	<i>Composição das comunidades presentes nos biofilmes</i>	61
5.1.1	Comunidade associada ao biofilme dos diferentes materiais suporte.....	61
5.1.2	Comunidade associada ao biofilme nas diferentes profundidades dos FBP	62
5.2	<i>Abundância das comunidades microbianas nos biofilmes</i>	64
5.2.1	Relação entre abundância de microrganismos e as diferentes profundidades dos FBP	66
5.2.2	Relação entre a abundância de microrganismos e os diferentes materiais suporte.....	70
5.2.3	Relação entre a abundância de microrganismos e as distintas COV	73
5.3	<i>Caracterização das comunidades do domínio Bacteria</i>	75
5.3.1	Seqüenciamento e identificação das bactérias.....	79
5.3.2	Diversidade bacteriana nos diferentes materiais suporte.....	82
5.3.3	Diversidade bacteriana nas diferentes profundidades dos filtros.....	84
5.4	<i>Evolução das comunidades microbianas presentes no topo e meio dos diferentes FBP em distintas COV (0,24 e 0,38 kgDBO/m³.dia)</i>	86
5.5	<i>Distribuição das comunidades de AOB presentes nos biofilmes das diferentes profundidades dos FBP em distintas COV (0,24 e 0,38 kgDBO/m³.dia)</i>	92
5.6	<i>Construção da biblioteca genômica do FBP preenchido por DHS na COV = 0,24 kgDBO/m³.dia</i>	95
6	CONCLUSÕES	103
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
8	REFERÊNCIAS	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** Fluxograma do sistema UASB-FBP (CHERNICHARO, 2007)..... **23**
- Figura 3.2.** Principais mecanismos envolvidos no transporte e conversão de amônia em biofilmes. Adaptado de Helmer-Madhok *et al.* (2002)..... **26**
- Figura 3.3.** Principais componentes de matrizes de origem biológica e estruturas típicas de biofilmes (FLORENCIO *et al.*, 2009). **35**
- Figura 3.4.** Fluxograma dos diferentes passos no estudo da estrutura e função de comunidades microbianas em amostras ambientais. Modificado de Muyzer e Smalla (1998). **40**
- Figura 4.1.** Aparato experimental utilizado na pesquisa: sistema UASB/FBP. A) Reator UASB; B) FBP; C) Visão superior dos FBP - materiais suporte..... **50**
- Figura 4.2.** Fluxograma do aparato experimental e identificação dos pontos de amostragem (ALMEIDA, 2007). **51**
- Figura 4.3.** Biofilmes aderidos aos materiais suporte (seta vermelha). A) escória de alto-forno; B) anéis plásticos; C) DHS (*Downflow Hanging Sponge*); D) aparas de conduíte..... **52**
- Figura 4.4.** Esquema de trabalho ilustrando as principais etapas experimentais utilizadas para identificação e quantificação dos microrganismos nos FBP nas três fases de operação..... **53**
- Figura 4.5.** *Primers* e programas utilizados nas reações de PCR. **56**
- Figura 4.6.** A) Equipamento de formação do gradiente de desnaturação do gel de DGGE (preparação do gel); B) Equipamento de DGGE (corrida do gel). **57**
- Figura 5.1.** Microscopia de contraste de fase do biofilme removido de materiais suporte: (A) Cianobactéria (*Anabaena* sp.) e diatomácea (*Navicula* sp.) – escória; (B) *Diplogaster* spp. (nematódeo) - DHS; (C) *Beggiatoa* – anéis plásticos; (D)

Aglomerado de cocos e algas verdes (ordem *Chlorella*) - anéis plásticos; (E) Diatomáceas e aglomerado de bacilos – escória; (F) *Beggiatoa* – DHS; (G) Aglomerados de cocos – anéis plásticos; (H) e (I) *Thiotrix* e *Zooglea*, respectivamente – escória. As barras representam 20µm. 63

Figura 5.2. Identificação *in situ* de domínio *Bacteria* (A e B), AOB (C e D), NOB (E e F) e *Thiobacillus denitrificans* (G e H) por hibridação específica com sondas marcadas com Cy3 (EUB338, Nso1225, NIT3 e TBD121, respectivamente). Campos microscópicos idênticos foram visualizados para o DAPI (A, C, E e G) e para as respectivas sondas específicas (B, D, F e H). As barras representam 25 µm. 65

Figura 5.3. Distribuição de *Bacteria*, AOB, NOB e *T. denitrificans* nos FBP. Os alvos das sondas são dados na Tabela 4.2. Cada gráfico mostra como a quantidade relativa de cada sonda comparada ao corante DAPI (eixo x) foi distribuída entre as diferentes profundidades e materiais suporte nos FBP. N = 10; Barras de erro = desvio padrão..... 67

Figura 5.4. Médias das concentrações (em mg/L) de N-amoniaco, N-nitrato, N-nitrito, DBO filtrada e NTK nas três profundidades e nos quatro diferentes materiais suporte nas duas COV impostas (adaptada de ALMEIDA *et al.*, 2007).69

Figura 5.5. Médias das concentrações de N-amoniaco (mg/l) e N-nitrato (mg/l) para todos os materiais suporte na COV=0,24 kgDBO/m³.dia (ALMEIDA *et al.*, 2007). 70

Figura 5.6. A) Distribuição de NOB (representadas pelas sondas Ntspa662 e NIT3) nos FBP. Cada gráfico mostra como a quantidade relativa de cada sonda comparada ao corante DAPI (eixo x) foi distribuída entre as diferentes profundidades e materiais suporte nos FBP. Barras de erro = desvio padrão; B) Médias das concentrações de N-amoniaco (mg/l) e nitrato (mg/l) para todos os materiais suporte nas condições operacionais da fase 1 (ALMEIDA *et al.*, 2007). 72

Figura 5.7. Eletroforese de DNA em géis de agarose 1%. A) extratos de DNA genômico de amostras de biofilme dos quatro FBP nas três alturas. Linhas 1-3:

escória; 1. topo, 2. meio, 3. fundo. Linhas 4-6: anéis plásticos; 4. topo, 5. meio, 6. fundo. Linhas 7-9: DHS; 7. topo, 8. meio, 9. fundo. Linhas 10-12: 10. topo, 11. fundo. B) produtos de PCR com *primers* 341F-GC e 907R, destinados à DGGE.
 75

Figura 5.8. Gel de DGGE para o domínio *Bacteria* (amostras de biofilme removidas dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,24 kgDBO/m³.d.). Os números indicam bandas cortadas, reamplificadas e seqüenciadas com sucesso. 76

Figura 5.9. Esquema dos perfis das bandas do gel de DGGE para o domínio *Bacteria* (amostras de biofilme removidas dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,24 kgDBO/m³.d.). Os números da esquerda indicam o número de bandas distintas no gel. Todas as bandas foram removidas..... 77

Figura 5.10. A) Matriz binária criada a partir dos padrões de bandas do gel de DGGE de *Bacteria* para os quatro FBP. Escória - 1. topo, 2. meio, 3. fundo. Anéis plásticos - 4. topo, 5. meio, 6. fundo. DHS - 7. topo, 8. meio, 9. fundo. Conduíte - 10. topo, 11. meio; B) Matriz de distância (coeficiente de similaridade de Jaccard); C) UPGMA. 78

Figura 5.11. Cromatograma da seqüência b18 gerado pelo software DNA Baser. Região comum aos *primers* 341F e 907R..... 80

Figura 5.12. Valores dos índices de diversidade de Shannon para amostras de biofilme removidas dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,24 kgDBO/m³.d..... 83

Figura 5.13. Análise de contingência (*Mosaic plot*) para o FBP preenchido por escória. A parte verde do gráfico representa a ocorrência de bandas nas distintas profundidades..... 85

Figura 5.15. Eletroforese de amplicons da PCR com *primers* para domínio *Bacteria*, destinados à DGGE em géis de agarose 1%. A) amostras de biofilme do topo dos quatro FBPs nas três fases de operação.1-4: Fase 1 - 1. escória, 2. anéis plásticos, 3. DHS, 4. conduíte; 5-8: Fase 2 - 5. escória, 6. anéis plásticos, 7.

DHS, 8. conduíte; 9-12: Fase 3 - 9. escória, 10. anéis plásticos, 11. DHS, 12. conduíte; B) amostras de biofilme do meio dos quatro FBP nas três fases de operação.	87
Figura 5.16. Géis de DGGE para o domínio <i>Bacteria</i> dos biofilmes coletados: A) no topo dos quatro materiais suporte (os números indicam bandas cortadas, reamplificadas e seqüenciadas). Amostras coletadas nas três fases de operação. 1-4: Fase 1 - 1. escória, 2. anéis plásticos, 3. DHS, 4. conduíte; 5-8: Fase 2 - 5. escória, 6. anéis plásticos, 7. DHS, 8. conduíte; 9-12: Fase 3 - 9. escória, 10. anéis plásticos, 11. DHS, 12. conduíte; B) no meio dos quatro materiais suporte (Zoom de 13.4x).	88
Figura 5.17. Valores dos índices de Shannon para o topo dos diferentes filtros biológicos percoladores nas três fases de operação.....	89
Figura 5.18. Valores dos índices de Shannon para o meio dos diferentes filtros biológicos percoladores nas três fases de operação.....	90
Figura 5.19. Eletroforeses de amplicons resultantes da PCR com <i>primers</i> específicos para o gene funcional <i>amoA</i> em géis de agarose 1%.	93
Figura 5.20. Eletroforeses de amplicons resultantes da PCR com <i>primers</i> específicos para o gene RNAr 16S, em géis de agarose 1%.	94
Figura 5.21. Eletroforese de DNA em géis de agarose 1%. A) extratos de DNA genômico de amostras de biofilme dos quatro FBP nas três alturas. Linhas 7-9: DHS; 7. topo, 8. meio, 9. fundo B) amplicons de DNAr 16S destinados à clonagem, obtidos dos extratos de DNA genômico do biofilme de três profundidades do DHS. Amostras coletadas na primeira fase de operação.	95
Figura 5.22. Placa de meio LB/ampicilina. Colônias brancas, apontadas pela seta, indicam a presença do vetor/inserto nas células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α . .	96
Figura 5.23. Árvore filogenética contendo seqüências (maiores que 700 nucleotídeos) do gene RNAr 16S da mistura de amostras de biofilme das três	

alturas do FBP preenchido por DHS (COV = 0,24 kgDBO/m³.d.), obtidas pela técnica PCR-clonagem. Análise de Bootstrap com 1000 réplicas. Barra = 2%.. **101**

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Descrição dos materiais suporte utilizados neste trabalho.....	24
Tabela 3.2. Fatores ambientais que afetam a nitrificação e implicações recorrentes.	28
Tabela 3.3. Comparação de características dos K e r - estrategistas.	31
Tabela 3.4. Novos processos de remoção de nitrogênio e respectivas reações e grupos predominantes.....	34
Tabela 4.1. Principais características do FBP e dos materiais de enchimento investigados.	51
Tabela 4.2. Características operacionais impostas aos FBP e período de monitoramento.	52
Tabela 4.3. Sondas e condições de hibridação utilizadas para FISH.	54
Tabela 4.4. <i>Primers</i> utilizados para a PCR	55
Tabela 5.1. Média aritmética do número de células por micrograma (peso úmido) de biofilme removido dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,24 kgDBO/m ³ .d.....	68
Tabela 5.2. Média aritmética do número de células por micrograma (peso úmido) de biofilme removido dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,38 kgDBO/m ³ .d.....	68
Tabela 5.3. Classificação das bandas seqüenciadas da DGGE para o domínio <i>Bacteria</i> , mediante análise comparativa entre o BLAST e a base de seqüências do NCBI.....	75

Tabela 5.4. Clones do FBP preenchido por DHS na COV = 0,24 kgDBO/m³.d. classificados em unidades taxonômicas operacionais (OTU). **91**

Tabela 5.5. Classificação das OTU seqüenciadas da clonagem para o domínio *Bacteria* do FBP preenchido por DHS na COV = 0,24 kgDBO/m³.d, mediante análise comparativa entre o BLAST e a base de seqüências do NCBI.....**92**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANAMMOX	<i>Anaerobic ammonium oxidation</i>
AOB	Bactérias oxidadoras de amônia (<i>ammonium oxidizing bacteria</i>)
CANON	<i>Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite</i>
CePTS	Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento
COPASA	Companhia de Saneamento do Estado de Minas Gerais
COV	Carga orgânica volumétrica
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DQO	Demanda química de oxigênio
EPS	Exopolissacarídeos
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
FBP	Filtro Biológico Percolador
FISH	Hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>)
NOB	Bactérias oxidadoras de nitrito (<i>nitrite oxidizing bacteria</i>)
OLAND	<i>Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification</i>
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SHARON	<i>Single reactor High activity Ammonium Removal Over Nitrite</i>
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TAS	Taxa de aplicação superficial
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TDH	Tempo de detenção hidráulica

UASB

Upflow Anaerobic Sludge Blanket

1 INTRODUÇÃO

A descarga de efluentes não tratados em corpos d'água receptores resulta em problemas ambientais severos, como o desequilíbrio das interações entre os indivíduos das comunidades e a morte da flora e fauna de rios e lagos. Dentre os diversos poluentes presentes em águas residuárias, a amônia se mostra como um dos mais importantes, em função de seus efeitos adversos em termos de toxicidade e da elevada demanda de oxigênio em corpos de água receptores.

A nitrificação é um processo chave na remoção de amônia de águas residuárias. Para satisfazer as exigências para a redução dos níveis de lançamento deste composto, várias estações de tratamento de esgotos (ETE) têm utilizado reatores com biofilmes para nitrificação, como filtros biológicos percoladores, biofiltros aerados submersos e leitos fluidizados aeróbios. Os filtros biológicos percoladores (FBP) são biorreatores de crescimento aderido, que utilizam plástico, materiais minerais inertes ou esponjas como substrato para o crescimento do biofilme. Usualmente, os biofilmes desenvolvidos nestes sistemas exibem considerável heterogeneidade, abrigando organismos de distintas complexidades (bactérias, protozoários, cianobactérias, rotíferos, nematódeos), devido à formação de variados microambientes físico-químicos. Este tipo de reator pode então ser utilizado para remover simultaneamente matéria orgânica, amônia e até para promover a desnitrificação, dependendo das condições operacionais impostas.

Os FBP, por apresentarem biomassa de crescimento aderido, possuem longos tempos de retenção de sólidos, sendo adequados para a retenção de organismos de crescimento lento, a exemplo das bactérias nitrificantes. Porém, a maior disponibilidade de matéria orgânica favorece o desenvolvimento de bactérias heterotróficas de crescimento rápido, que tendem a se desenvolver na camada superficial do biofilme, onde há maior disponibilidade de oxigênio dissolvido. A competição entre bactérias heterotróficas e autotróficas por espaço e oxigênio pode limitar o processo de nitrificação nas camadas mais internas da matriz biológica dependendo das cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas (WIJEYEKOON *et al.*, 2004).

A influência de diferentes COV na composição, distribuição e abundância de microrganismos, associadas aos resultados de desempenho dos reatores é em geral investigada em reatores em escala de bancada, abrigando biofilmes relativamente jovens, ou em modelos artificiais de biofilmes. Os reatores de bancada, em sua maioria, utilizam esgotos sintéticos de composição

determinada, ao contrário dos reatores em escala de demonstração, que estão sujeitos a variações diárias da composição dos esgotos (picos de COV, alterações sazonais de vazão, de pH, etc.). Acredita-se que a realização destas pesquisas em reatores em escala de demonstração permitiria maior aproximação aos de escala real, levando ao aprimoramento das tecnologias de tratamento dos esgotos, sob a perspectiva do controle operacional e eficiência.

Com base nessas informações, foi concebido o presente estudo em filtros biológicos percoladores pós-reator anaróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB), visando avaliar a influência das condições ambientais proporcionadas por diferentes tipos de materiais suporte (escória de alto-forno, anéis plásticos, *Downflow Hanging Sponge* e aparas de conduíte), profundidades distintas e duas diferentes COV nas abundâncias, distribuição e diversidades microbianas, assim como no desempenho dos reatores (remoção de amônia). O sistema UASB-FBP, em escala de demonstração, foi implantado no CePTS (Centro de Pesquisas e Treinamento em Saneamento), localizado na Estação de Tratamento de Esgotos Arrudas (COPASA) em Belo Horizonte – MG. A operação e monitoramento dos reatores foram realizados ao longo de aproximadamente três anos e geraram resultados para o estudo de Almeida (2007), que verificou, entre outros objetivos, o efeito de diferentes tipos de materiais suporte na remoção de amônia, e seus resultados de concentrações de compostos nitrogenados e DBO foram utilizados neste trabalho.

Considerando as limitações das técnicas de cultivo tradicionalmente aplicadas nos estudos de ecologia microbiana, foram utilizados métodos de biologia molecular para a obtenção de dados mais completos e confiáveis sobre a estrutura das comunidades bacterianas. Desde que a presença e abundância de determinadas nitrificantes podem ser correlacionadas às suas atividades fisiológicas, a comparação entre as contagens baseadas em hibridações específicas para nitrificantes (*Fluorescent in situ hybridization* - FISH) e os resultados das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e DBO podem proporcionar informações úteis sobre o desempenho dos reatores, considerando a eliminação de amônia. As alterações da composição das comunidades de *Bacteria* com o aumento da COV ao longo de três anos foram monitoradas em três diferentes profundidades dos FBP, pelas técnicas eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) e clonagem.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Estudar a influência das condições ambientais proporcionadas por diferentes tipos de materiais suporte, profundidades distintas e duas diferentes cargas orgânicas volumétricas nas abundâncias, distribuições e diversidades microbianas, assim como no desempenho dos reatores (remoção de amônia) em quatro filtros biológicos percoladores pós-reator UASB tratando esgoto doméstico.

2.2 *Objetivos específicos*

- (1) Avaliar as comunidades associadas aos biofilmes dos FBP de forma qualitativa, por microscopia de contraste de fase;
- (2) Associar as abundâncias de *Bacteria* e de comunidades microbianas específicas envolvidas em processos de remoção de nitrogênio (bactérias oxidadoras de amônia - AOB, bactérias oxidadoras de nitrito - NOB, anammox e a bactéria desnitrificante autotrófica - *Thiobacillus denitrificans*) às concentrações de amônia e matéria orgânica nas diferentes profundidades dos FBP, mediante hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH);
- (3) Correlacionar as abundâncias de AOB e NOB às concentrações de nitrito e nitrato nas diferentes profundidades dos filtros pela técnica FISH;
- (4) Determinar a relação entre os diferentes materiais suporte e as distintas abundâncias de *Bacteria*, AOB, NOB, anammox e *T. denitrificans* pela técnica FISH;
- (5) Avaliar a influência de distintas COV nas abundâncias de *Bacteria*, AOB, NOB, anammox e *T. denitrificans*, pelo método FISH;
- (6) Examinar as diversidades de *Bacteria* e AOB nos diferentes materiais suporte, profundidades e COV, mediante eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE);
- (7) Construir uma biblioteca genômica do FBP que apresentar a melhor associação de resultados de parâmetros microbiológicos e físico-químicos, pelo método de clonagem.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sistema UASB-Filtro Biológico Percolador

Em termos de tecnologias simplificadas de tratamento de esgoto doméstico, o uso de reatores UASB tem se tornado uma alternativa bastante atraente tendo em vista as seguintes vantagens associadas: (i) baixo consumo energético, (ii) baixa demanda de área, (iii) baixos custos de implantação e operação, (iv) baixa produção de lodo. Estes reatores apresentam eficiência típica de remoção de DBO da ordem de 70%, contudo, podem apresentar dificuldades de atendimento a padrões de lançamento de nutrientes, uma vez que a remoção de nitrogênio e fósforo nos processos anaeróbios é insignificante, devendo-se quase que exclusivamente ao consumo para síntese celular. Mesmo considerando as flexibilizações que constam nas legislações ambientais em vigência, torna-se necessária a implantação de uma etapa de pós-tratamento dos efluentes para adequá-los a tais requisitos e propiciar a proteção dos corpos d'água receptores do lançamento de esgotos (CHERNICHARO, 2007).

Os filtros biológicos percoladores (FBP) são sabidamente sistemas de pós-tratamento de esgotos domésticos que podem encontrar elevada aplicabilidade no Brasil, tendo em vista, principalmente, a sua simplicidade e baixo custo operacional (Figura 3.1). São biorreatores de crescimento aderido, que utilizam materiais inertes como suporte para o crescimento do biofilme. O efluente do reator UASB é distribuído na parte de cima do filtro, e enquanto percola em fluxo descendente pelos materiais suporte, os microrganismos presentes no biofilme degradam matéria orgânica, nitrificam e desnitrificam, dependendo das condições operacionais impostas (WIK, 2003).

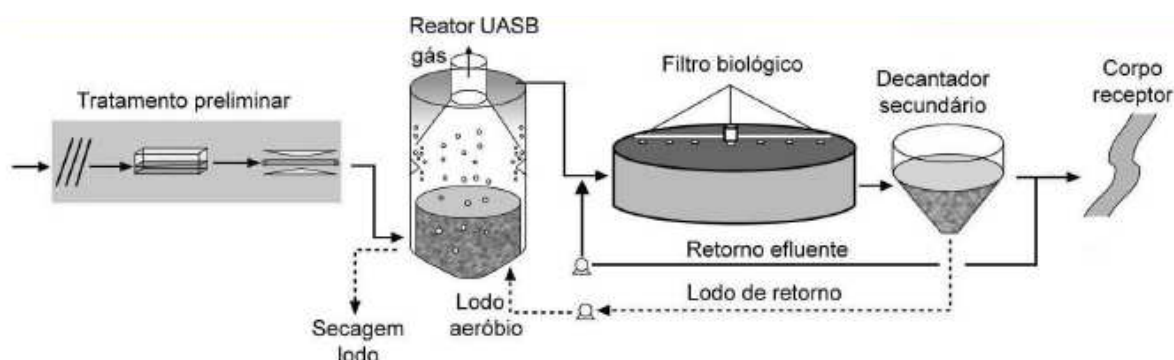


Figura 3.1. Fluxograma do sistema UASB-FBP (CHERNICHARO, 2007).

Entre os materiais de enchimento pesquisados e empregados em filtros biológicos percoladores, filtros biológicos aerados submersos, biodiscos e reatores de leito fluidizado/expandido, podem-se citar: areia, carvão antracitoso, carvão ativado granular, pedra britada, escória de alto-forno, anéis plásticos randômicos, blocos cross-flow, *Downflow Hanging Sponge* (concebidos por Machdar *et al.* 1997). Neste trabalho foram utilizados os materiais: escória de alto-forno, anéis plásticos randômicos, DHS e aparas de conduíte, e suas descrições estão listadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Descrição dos materiais suporte utilizados neste trabalho.

Materiais suporte	Área superficial (m ² /m ³)	Peso específico (kg/m ³)	Breve descrição e comentários adicionais
Escória de alto-forno Granulometria: entre 5 e 10 cm	60	1350	<ul style="list-style-type: none"> • Material residual de indústria siderúrgica, tradicionalmente utilizado como enchimento de FBP; • Apresenta superfície irregular, elevado peso específico e porosidade; • O atendimento às especificações técnicas em termos de granulometria é uma limitação em termos de uso.
Anéis plásticos randômicos	80	50	<ul style="list-style-type: none"> • Tradicionalmente utilizados em FBP; • Possui satisfatório índice de vazios e área superficial específica; • A aplicabilidade de uso do enchimento é geralmente limitada em função dos custos de aquisição (da ordem de R\$ 600,00/m³).
Downflow hanging sponge (DHS)	87	Nd	<ul style="list-style-type: none"> • Constituído de séries de cortinas verticais (dispostas lado a lado) com várias secções triangulares de espumas de poliuretano coladas; • Recentes pesquisas demonstram uma grande potencialidade do sistema em termos de desempenho na remoção de matéria orgânica e N-amoniaco em virtude das boas características de retenção de biomassa nos interstícios da espuma; • Os custos de aquisição, embora não aferidos em escala real, ainda podem ser elevados tendo em vista o uso da espuma como principal material de constituição; • Uma vez que as cortinas são fixadas na parte superior do FBP, não há necessidade de previsão de fundo falso para o FBP.
Aparas de conduíte corrugado	220	54,2	<ul style="list-style-type: none"> • Constituído de elementos de 3 cm de comprimento em polipropileno corrugado; • Sua aplicabilidade primária é o cobrimento e proteção de fiação elétrica em residências; • Embora possua elevada área superficial específica o umedecimento de todo o material é dificultado pela sua geometria cilíndrica; • Os custos totais de aquisição e beneficiamento (corte) podem ser elevados (da ordem de 550,00/m³).

FONTE: ALMEIDA (2007).

Vale ressaltar que o DHS apresenta em sua constituição mais de 90% de espaços vazios, resultando em significativo aumento na retenção intersticial de biomassa e, deste modo, em maiores tempos de retenção de sólidos (TANDUKAR *et al.*, 2007). Tais fatores são considerados extremamente favoráveis ao desenvolvimento de bactérias nitrificantes, devido à baixa taxa de crescimento destes microrganismos.

Comparados aos reatores de biofilmes utilizados recentemente, os FBP possuem baixa capacidade volumétrica, mas apresentam vantagens importantes, como relativos baixos custos de implantação e operação, baixa produção de lodo excedente, além de serem robustos. Vale ressaltar sua capacidade de suportar a picos de cargas e toxicidade (GRADY e LIM, 1980). Suas desvantagens estão associadas ao custo para elevar o efluente ao topo do reator, à predação do biofilme por nematódeos, protozoários e outros, e aos baixos tempos de retenção. Estes baixos tempos de retenção implicam em picos de cargas, que resultam em picos de determinados compostos nos efluentes, dependendo da aplicação do filtro (WIK, 2003).

O aprofundamento no conhecimento dos processos envolvidos, aliado às descobertas no campo da microbiologia e de novos processos biológicos, permitiu o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e mais econômicas. Em relação ao emprego de filtro biológico percolador para o pós-tratamento de efluentes de reatores UASB, a literatura especializada reporta ainda poucas unidades para a remoção de matéria orgânica carbonácea, com desempenho satisfatório (GONÇALVES *et al.*, 2001; CHERNICHARO, 2007), e outros reatores utilizados apenas para nitrificação (filtros percoladores nitrificantes), também eficientes (LYDMARK *et al.*, 2006).

3.2 Remoção biológica de nitrogênio

O nitrogênio existe no ambiente em vários estados de oxidação, principalmente nas formas de nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e nitrogênio gasoso (N_2). Os lançamentos de efluentes contendo nitrogênio amoniacal e nitrato resultam na depleção de oxigênio e eutrofização nos corpos receptores, afetam a eficiência dos processos de desinfecção por cloro, e apresentam toxicidade para a vida aquática. Estes compostos podem ser removidos de águas residuárias por uma variedade de processos físico-químicos e biológicos, sendo os biológicos mais efetivos, relativamente mais baratos e, portanto, mais amplamente aplicados (EPA, 1993).

Embora os métodos tradicionais para remoção de amônia de águas residuárias sejam eficientes, eles apresentam custos elevados, requerem adição de produtos químicos e podem

liberar compostos tóxicos no ambiente. Esses fatores são os principais responsáveis pela preferência da utilização de processos biológicos para a remoção de nitrogênio. A remoção biológica convencional de nitrogênio requer um processo de duas fases, envolvendo nitrificação seguida de desnitrificação. A Figura 3.2 apresenta os principais mecanismos envolvidos no transporte e conversão de amônia em biofilmes (HELMER-MADHOK *et al.*, 2002).

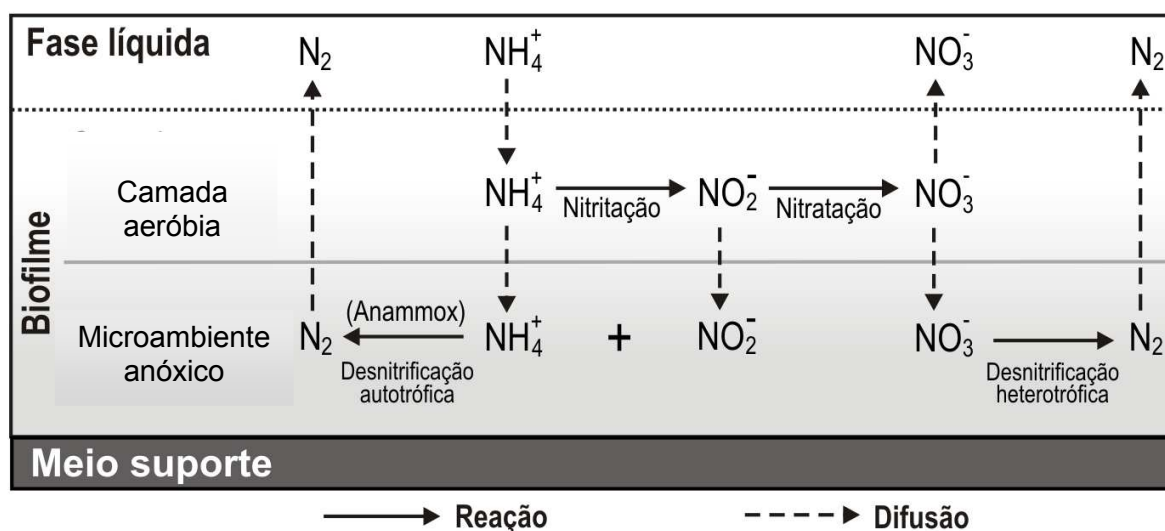
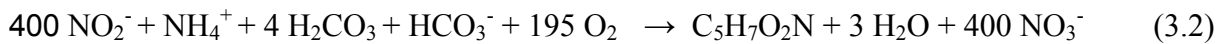
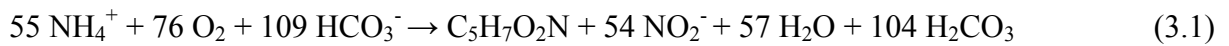


Figura 3.2. Principais mecanismos envolvidos no transporte e conversão de amônia em biofilmes. Adaptado de Helmer-Madhok *et al.* (2002).

O processo ou sistema de tratamento biológico a ser escolhido está intrinsecamente relacionado ao tipo de microrganismo que se pretende favorecer o desenvolvimento. Os biorreatores que operam sob condições de aeração possibilitam o desenvolvimento de microrganismos aeróbios, que através da respiração aeróbia oxidam as moléculas orgânicas e/ou inorgânicas. Nos biorreatores anaeróbios, por sua vez, são selecionados microrganismos capazes de utilizar o metabolismo fermentativo ou respiração anaeróbia. Portanto, a oxidação dos compostos pode ocorrer por diferentes vias do metabolismo microbiano, o que possibilita o desenvolvimento de vários aspectos da engenharia dos biorreatores, resultando em variantes dos processos aeróbios e anaeróbios usuais (VAZOLLER, 1988).

3.2.1 Nitrificação

A nitrificação implica na oxidação quimiolitoautotrófica da amônia a nitrato, sob condições aeróbias estritas, e é conduzida em dois estágios oxidativos sequenciais: amônia a nitrito (nitritação) e de nitrito a nitrato (nitratação) (Equações 3.1 e 3.2, respectivamente).



Cada estágio é realizado por gêneros de bactérias diferentes, que utilizam amônia ou nitrito como fonte de energia, oxigênio molecular como acceptor de elétrons, e compostos de carbono inorgânico (como CO_2 e HCO_3^-) como fonte de carbono. O gênero de bactéria oxidadora de amônia (AOB) mais comumente encontrado em estações de tratamento de esgotos é *Nitrosomonas* (MOBARRY *et al.*, 1996; JURETSCHKO *et al.*, 1998; OKABE *et al.*, 1999), entretanto, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus* são também capazes de oxidar amônia a nitrito. Biesterfeld (2001) e Persson (2002) investigaram biofilmes de filtros biológicos percoladores nitrificantes em diferentes profundidades e verificaram que as AOB predominantes eram as do gênero *Nitrosomonas*, sendo que *Nitrosospira* não foram encontradas em nenhum nível dos filtros.

No estágio de oxidação do nitrito, diversos gêneros de bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) são conhecidos, como *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* e *Nitrocystis*. Entretanto, *Nitrospira* é o gênero mais comumente encontrado em ETE atualmente, embora *Nitrobacter* também tenha sido relatado em lodos ativados (SHRAMM *et al.*, 1996; PERSSON *et al.*, 2002). A maioria dos grupos de AOB e NOB apresenta taxas de crescimento lentas e baixa produção de biomassa, o que dificulta o estudo dessas bactérias por serem difíceis de isolar em cultura pura (PROSSER, 1989). O desenvolvimento de técnicas moleculares permitiu maior entendimento da diversidade e distribuição de AOB e NOB em ambientes naturais do que o oferecido pelos métodos baseados em cultivo (AMANN *et al.*, 1995; JURETSCHKO *et al.*, 1998).

A nitrificação pode ser influenciada por diversos fatores ambientais, como oxigênio dissolvido, alcalinidade, pH e temperatura (Tabela 3.2). Entretanto, os valores de alcalinidade, pH e temperatura usualmente encontrados no esgoto doméstico são adequados para a nitrificação. O efeito de altas concentrações de matéria orgânica na eficiência de nitrificação merece destaque por afetar a concentração de oxigênio dissolvido e por favorecer o crescimento de bactérias heterotróficas, que competem por oxigênio e espaço com as autotróficas nitrificantes (FIGUEROA e SILVERSTEIN, 1992; WIJEYEKOON *et al.*, 2004).

Embora a maioria dos estudos esteja focada no efeito da DBO solúvel ou particulada na eficiência de nitrificação (SÄRNER e MARKLUND, 1984), Figueroa e Silverstein (1992) verificaram que tanto a DBO particulada quanto a solúvel inibiram de maneira idêntica a

nitrificação. Concluíram, assim, que a DBO total seria um melhor indicativo de inibição da nitrificação do que a DBO solúvel.

Tabela 3.2. Fatores ambientais que afetam a nitrificação e implicações recorrentes.

Fator interveniente	Implicações recorrentes
<p><u>Concentração de OD</u></p> <p>Requisitos de O₂ (fase líquida): - para nitrificação: 1,8 mgO₂/L. - para ocorrência de acúmulo de nitrito: 0,5 mgO₂/L.</p> <p><i>*não computados os requisitos de O₂ para biomassa heterotrófica.</i></p>	<p>Microrganismos nitrificantes são estritamente aeróbios. Caso o oxigênio não seja suficiente para atender aos requisitos da biomassa heterotrófica e nitrificante a taxa de remoção de amônia decresce em função da competição por oxigênio, predominantemente capturado pela biomassa heterotrófica nas porções externas do biofilme.</p> <p>A baixa disponibilidade de OD exerce maior efeito inibitório sobre NOB do que em AOB, podendo resultar em acúmulo de nitrito no sistema.</p>
<p><u>Temperatura</u></p> <p>Temperatura ótima para nitrificação: 28 a 36 °C (cultura pura).</p> <p><i>Taxas de crescimento específico (μ) variam em função da temperatura. A avaliação dos efeitos da temperatura no tratamento de esgoto apresenta complexidade em virtude de outros fatores intervenientes.</i></p>	<p>Os efeitos da temperatura podem variar em função da taxa de remoção de amônia: sistemas com elevadas taxas de nitrificação são mais afetados pela temperatura do que sistemas onde a taxa de nitrificação tende a ser menor. Fatores como disponibilidade de oxigênio, predadores, cargas orgânicas podem obscurecer a avaliação do efeito da temperatura em sistemas de tratamento de esgotos.</p>
<p><u>Concentração de matéria orgânica solúvel e particulada</u></p> <p>- DBO solúvel acima de 20 mg/L: <i>FBPs apresentam maior dificuldade em produzir nitrato.</i></p> <p>- DBO solúvel abaixo de 12 mg/L: <i>favorável para ocorrência de nitrificação em FBPs.</i></p>	<p>Para elevadas concentrações de matéria orgânica a nitrificação diminui, pois a biomassa heterotrófica compete com sucesso por oxigênio e espaço, expulsando microrganismos nitrificantes do biofilme.</p> <p><i>Matéria orgânica solúvel:</i> intensifica o crescimento de microrganismos heterotróficos elevando espessura do biofilme, o que dificulta a transferência de substrato (N-amoniaco) e oxigênio para porções internas do biofilme.</p> <p><i>Matéria orgânica particulada:</i> uma vez depositada na superfície do biofilme pode dificultar a transferência de oxigênio e de substratos solúveis. Posteriormente, a hidrólise do material possibilita a sua absorção favorecendo o incremento da biomassa heterotrófica.</p>
<p><u>Relação DBO:NTK</u></p> <p>DBO:NTK = 25: <i>pouca disponibilidade de formas reduzidas de nitrogênio para nitrificação.</i></p> <p>DBO:NTK = 5 a 10: <i>pode ser favorável ao processo de nitrificação, a depender das condições operacionais impostas.</i></p>	<p>Maiores relações DBO:NTK favorecem a predominância da biomassa heterotrófica no biofilme em virtude da maior taxa de crescimento específico e fluxo de síntese observado para esses microrganismos. Adicionalmente, a síntese da biomassa heterotrófica diminui a concentração de formas reduzidas de nitrogênio como a amônia.</p>
<p><u>pH e alcalinidade</u></p> <p>- pH ótimo para nitrificação em biofilmes: 7,5 a 8,5. - Alcalinidade residual mínima para nitrificação em sistemas com biofilmes: > 45 mg/L (observado) 50 mg/L (recomendado).</p>	<p>pH: a taxa de nitrificação declina substancialmente para valores abaixo de 6,8.</p> <p>Alcalinidade: escassez de alcalinidade carbonato no sistema impede a síntese de microrganismos nitrificantes por déficit de carbono inorgânico. Adicionalmente, a manutenção do pH em faixas adequadas para ocorrência de nitrificação pode ser comprometida.</p>

FONTE: Adaptado de Almeida (2007).

3.2.1.1 Bactérias oxidadoras de amônia (AOB)

A oxidação da amônia (NH_4^+) é realizada pelas AOB e ocorre em duas etapas. Primeiramente, a NH_4^+ é oxidada a hidroxilamina (NH_2OH), reação catalisada pela enzima amônia monooxigenase (*amoA*), que tem o oxigênio e tetróxido de dinitrogênio (dímero do NO_2) como aceptores de elétrons preferenciais. Logo após, a NH_2OH é oxidada a nitrito (NO_2^-) pela hidroxilamina oxidoreductase (SAYAVEDRA-SOTO *et al.*, 1994).

Análises comparativas de seqüências de RNAr 16S de AOB cultivadas revelaram que estas bactérias estão divididas em dois grupos monofiléticos dentro das *Proteobacteria* (PURKHOLD *et al.*, 2000; TESKE *et al.*, 1994). Um grupo compreende linhagens de *Nitrosomonas* (incluindo *Nitrosococcus mobilis*), *Nitrospira* spp., *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio* na classe β -*Proteobacteria*. Foi sugerido recentemente que os três últimos gêneros deveriam ser reclassificados no gênero *Nitrospira*. O outro grupo (classe γ -*Proteobacteria*) contém *Nitrosococcus oceani* e *Nitrosococcus halophilus*. A base de dados de seqüências do gene RNAr 16S de AOB (*Ribosomal Data Base*) está continuamente em expansão, devido a intensos estudos sobre o tema. A disponibilidade destas seqüências forneceu uma importante base para o desenvolvimento de métodos independentes de cultivo para investigar a diversidade e composição da comunidade de AOB em ambientes complexos, como em reatores com biofilmes. Purkhold *et al.* (2000), estudaram reatores de biofilmes e lodos ativados em 11 ETEs, e assim, completaram a base de dados de seqüências de DNAr 16S e do gene funcional *amoA* considerando as espécies de AOB descritas até então, pelos métodos de PCR-clonagem-seqüenciamento-árvores filogenéticas.

Diversos estudos sugerem que existem diferenças fisiológicas e ecológicas entre diferentes gêneros e linhagens de AOB e que fatores ambientais como salinidade, pH e concentrações de amônia e sólidos particulados em suspensão (Tabela 3.2) são fatores de seleção para certas espécies de AOB (deBIE *et al.*, 2001; KOOPS *et al.*, 2001). Estes fatores externos, que incluem as variações na composição de efluentes de estações de tratamento de esgotos, podem influenciar a faixa de diversidade de AOB e conseqüentemente a estrutura e a função da comunidade oxidadora de amônia. A maioria das pesquisas tem enfatizado o estudo da composição da comunidade de AOB em ETEs de lodos ativados (DIONISI *et al.*, 2002; JURETSCHKO *et al.*, 1998; HOVANEC *et al.*, 1996), sendo que em FBPs poucos estudos foram realizados com este fim (ROWAN *et al.*, 2003; LYDMARK *et al.*, 2006).

3.2.1.2 Bactérias oxidadoras de nitrito (NOB)

A oxidação do nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-) é catalisada pela enzima nitrito oxidoreductase (KIRSTEIN *et al.*, 1993), e é realizada por NOB que pertencem a quatro gêneros diferentes: *Nitrobacter* (α -Proteobacteria), *Nitrococcus* (γ -Proteobacteria), *Nitrospina* (δ -Proteobacteria) e *Nitrospira* (filo *Nitrospira*). Enquanto espécies de *Nitrobacter* têm sido isoladas de uma variedade de ambientes incluindo solo e águas doces, é amplamente assumido que os outros três gêneros são de ambientes marinhos. Em estudos recentes, entretanto, bactérias relacionadas a *Nitrospira* foram encontradas em diferentes ambientes não marinhos, incluindo sistemas de tratamento de esgotos de lodos ativados (DAIMS *et al.*, 2001).

Em contraste a alguns trabalhos que afirmam que *Nitrobacter* sp. é a oxidadora de nitrito dominante em ETEs, Juretschko *et al.* (1998) propuseram que *Nitrospira* é o gênero dominante no processo de oxidação do nitrito em biorreatores em escala real e de bancada. O predomínio de *Nitrospira* é considerado um reflexo das diferentes estratégias de sobrevivência que estas NOB desenvolveram para a conservação da competição e até mesmo para a co-existência com outras comunidades de bactérias que consomem o mesmo substrato nos biofilmes.

Em termos de cinética de saturação, dois tipos de estratégias para vencer a competição entre dois grupos de microrganismos pelo mesmo substrato são destacados em ecologia microbiana: K-estratégia (alta afinidade pelo substrato em baixas concentrações do mesmo) e r-estratégia (altas taxas de crescimento máximo específico e de utilização de substrato em altas concentrações deste). Considerando a equação de Monod, as espécies bacterianas não podem ser competidoras bem sucedidas em ambas as situações de baixas e altas concentrações de substrato (LU, 2006).

Schramm *et al.* (1999), combinando resultados da técnica FISH e de análises físico-químicas com micro eletrodos em sistemas de lodos ativados, demonstraram que *Nitrospira* são K-estrategistas, possuindo baixa taxa de crescimento específico máxima, e são bem adaptadas a baixas concentrações de nitrito e oxigênio. Isto ocorre porque seu desenvolvimento lento suporta a baixa disponibilidade destes recursos, resistindo assim, às condições adversas impostas diariamente às ETEs.

Nitrobacter sp., por sua vez, foi classificada como r-estrategista de alta taxa de crescimento máximo, e por isso requerem recursos abundantes para suportar seu rápido desenvolvimento.

Possuindo baixa afinidade por nitrito e oxigênio, somente prosperam se estes estiverem presentes em altas concentrações. Dado que várias ETEs têm seus desempenhos de nitrificação interrompidos diariamente, estudos sobre a fisiologia de *Nitrospira* são de fundamental importância para encontrar medidas para estabilizar este importante passo na remoção de nutrientes. A Tabela 3.3 apresenta um resumo das características dos K e r - estrategistas.

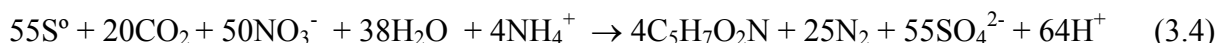
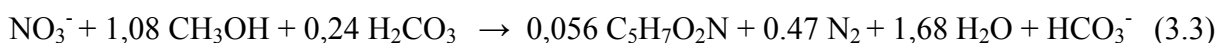
Tabela 3.3. Comparação de características dos K e r - estrategistas.

K - Estrategistas	r - Estrategistas
Crescimento lento	Crescimento rápido
Prosperam nas condições de crescimento da sucessão tardia	Prosperam nas condições de crescimento do início da sucessão
Proliferam próximo ou exatamente na capacidade de carga do sistema	Proliferam em abundância de recursos
Altas afinidades pelo recurso e quando este é limitante são mais competitivas	Baixa afinidade pelo recurso e quando este é limitante são pouco competitivos
Tamanho da população é constante, e menos variável em um sistema dinâmico	Tamanho da população altamente variável; pode haver substituição de nicho por outro r - estrategista que desempenha função similar
Tolerante a mudanças no ambiente local	Mudanças contínuas e dramáticas nas populações ocorrem em ETEs devido à variação diurna
<i>Nitrospira</i> sp.	<i>Nitrobacter</i> sp.

FONTE: Adaptado de Koh *et al.* 2008.

3.2.2 Desnitrificação

Os compostos oxidados de nitrogênio (NO_2^- e NO_3^-) produzidos na nitrificação são reduzidos a nitrogênio gasoso (N_2) em condições anóxicas por um processo denominado desnitrificação (Figura 3.2). Este processo é realizado geralmente por bactérias heterotróficas que utilizam nitrito ou nitrato como aceptores de elétrons e matéria orgânica como fontes de carbono e energia (Equação 3.3). Contudo, a produção de N_2 a partir de compostos inorgânicos de nitrogênio pode também ser desempenhada por microrganismos desnitrificantes autotróficos. Neste caso, a fonte de energia vem de reações inorgânicas de oxidação-redução, tendo elementos como hidrogênio ou compostos reduzidos de enxofre (HS^- , H_2S , S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, etc.) como doadores de elétrons, nitrato como acceptor de elétrons e compostos de carbono inorgânico (CO_2 ou HCO_3^-) como fonte de carbono (Equação 3.4) (AHN, 2006).



Desta forma, o processo de desnitrificação pode ser desempenhado por vários organismos quimiorganotróficos, litoautotróficos, bactérias fototróficas e alguns fungos. A habilidade de desnitrificar é comum entre as bactérias Gram-negativas pertencentes às classes α e β de *Proteobacteria*, como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Contudo, bactérias Gram-positivas (como *Bacillus*) e algumas arqueias (como *Halobacterium*) são também capazes de desnitrificar (ZUMFT, 1992).

Embora várias bactérias quimiolitoautotróficas sejam conhecidas por serem capazes de utilizar o nitrato como aceptor de elétrons e uma fonte de energia inorgânica (H_2 ou S^0 , H_2S , S_2O_3^-), esse processo tem tido pouca aplicação em estações de tratamento de esgoto doméstico. Isto se deve ao fato de que a maioria das águas residuárias contém matéria orgânica suficiente para que a desnitrificação heterotrófica ocorra. Como alternativa para remover nitrato em sistemas de pós-tratamento de efluentes com baixas concentrações de matéria orgânica, há o processo de desnitrificação autotrófica, que tem recebido maior atenção recentemente, devido a duas grandes vantagens comparadas aos processos biológicos heterotróficos. Primeiramente, não é necessária adição de fonte externa de carbono orgânico (metanol, etanol, etc.), o que diminui os custos do processo e, além disso, há menor produção de lodo, que está associada à menor produção de biomassa (ZHANG e LAMPE, 1999).

3.2.3 Novos processos utilizados na remoção de nitrogênio

Estudos recentes mostram que vários processos microbianos envolvendo o ciclo do nitrogênio podem ocorrer em estações de tratamento de esgotos (ETE). Isto se deve à grande versatilidade metabólica das bactérias envolvidas nos processos de eliminação de nutrientes, o que torna o estudo da remoção do nitrogênio ainda mais complexo, pois o próprio balanço de massa do processo torna-se difícil, uma vez que não se sabe ao certo qual processo foi envolvido na remoção de nitrogênio (HELMER *et al.*, 1999).

Até a década de 90 apenas processos aeróbios vinham sendo discutidos para a oxidação do amônio, e acreditava-se ser impossível o desenvolvimento de processos anaeróbios de remoção de amônia de águas residuárias. No entanto, Mulder *et al.* (1995) observaram a perda de amônia em um reator desnitrificante de leito fluidizado aplicado ao tratamento de efluentes de um reator metanogênico, que foi operado para degradação de resíduos de uma indústria de

fermento, em Delft (Holanda). Neste mesmo reator foi verificado elevado consumo de amônia e nitrato com concomitante produção de gás. Experimentos em fluxo contínuo demonstraram a estequiometria do processo como sendo de 5mol de NH_4^+ para cada 3mol de NO_3^- , resultando em 4mol de N_2 . Ficou então comprovada a descoberta de um novo processo de oxidação anaeróbia da amônia, em que a amônia era oxidada a nitrogênio gasoso sob condições anóxicas, com nitrito servindo como acceptor de elétrons. Este processo foi denominado *Anaerobic ammonium oxidation* (ANAMMOX), e provavelmente foi o responsável pelas perdas substanciais de nitrogênio em reatores operando com efluentes de baixas concentrações de oxigênio dissolvido e DQO (SLIEKERS *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, a literatura tem apresentado relatos de várias pesquisas sobre processos não-convencionais de remoção de nitrogênio (GÓRSKA *et al.*, 1997; VERSTRAETE e PHILIPS, 1998). Os sistemas de nitrificação onde íon amônio é parcialmente convertido a nitrito (prevenindo a formação de nitrato), tais como OLAND (*Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification*), SHARON (*Single reactor High activity Ammonium Removal Over Nitrite*) e CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*) (Tabela 3.4), podem ser associados à desnitrificação autotrófica pela oxidação anaeróbia da amônia. Desta maneira, o processo torna-se auto-sustentável, uma vez que não há necessidade de adição de nitrito ou fonte externa de carbono, e possibilita uma economia significativa de oxigênio (energia) com a nitrificação parcial em relação ao processo tradicional (FUX *et al.*, 2002).

O processo SHARON baseia-se no estabelecimento de um “curto-circuito” nos processos de nitrificação e desnitrificação. A nitrificação é interrompida em etapa intermediária, de modo a manter o nitrogênio na forma de nitrito, e a conversão de nitrito a nitrogênio gasoso ocorre na etapa subsequente. Há economia de energia e doadores de elétrons para a desnitrificação. Para tanto, aproveita-se o fato de que em altas temperaturas, as NOB têm crescimento mais lento que as AOB. Devido ao curto tempo de detenção hidráulica (TDH) (aproximadamente um dia) e à alta temperatura (35°C), as NOB são “lavadas” do reator. A temperatura, associada ao curto tempo de detenção hidráulica (TDH), torna-se um fator de seletividade, pois a 35°C a máxima velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de NOB é aproximadamente a metade do que a das AOB (VERSTRAETE e PHILIPS, 1998; JETTEN *et al.*, 2001).

Tabela 3.4. Novos processos de remoção de nitrogênio e respectivas reações e grupos predominantes.

Processos	Reações	Grupos predominantes
ANAMMOX	$3 \text{NO}_3^- + 5 \text{NH}_4^+ \rightarrow 4 \text{N}_2 + 9 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}^+$	<i>Candidatus</i> Brocadia Anammoxidans/ <i>Candidatus</i> <i>Kuenenia stuttgartiensis</i>
SHARON	$\text{NH}_4^+ + 1,5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}^+$	AOB (<i>Nitrosomonas</i>)
CANON	(1) $\text{NH}_4^+ + 1,5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$ (2) $\text{NH}_4^+ + 1,32 \text{NO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow 1,02 \text{N}_2 + 0,26 \text{NO}_3^- + 2 \text{H}_2\text{O}$	AOB + ANAMMOX
OLAND	(1) $0,5 \text{NH}_4^+ + 0,75 \text{O}_2 \rightarrow 0,5 \text{NO}_2^- + 0,5 \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$ (2) $0,5 \text{NH}_4^+ + 0,5 \text{NO}_2^- \rightarrow 0,5 \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$	AOB (<i>Nitrosomonas</i>)

Outra forma de remoção de nitrogênio é o processo OLAND onde o oxigênio é fornecido em quantidade estequiométrica para que a nitrificação proceda apenas até nitrito e, subseqüentemente, devido à escassez de aceptores de elétrons, o nitrito formado é consumido para oxidar o restante do amônio. Este processo comparado ao processo de nitrificação e desnitrificação convencional permite uma economia de 62,5% de oxigênio (energia) e 100% de agente redutor (fonte de carbono orgânico). Além de que, a oxidação direta de amônio a nitrogênio gasoso pode ser alcançada em uma única fase (VERSTRAETE e PHILIPS, 1998).

Bactérias que oxidam amônio a nitrito necessitam de oxigênio, enquanto bactérias que convertem nitrito a nitrogênio gasoso são anaeróbias facultativas. Recentemente tem sido mostrado que ambas as bactérias podem co-existir em um único reator desde que o sistema seja mantido em condições de oxigênio limitado. Esta é a base do processo CANON, onde o íon amônio é parcialmente convertido a nitrito por AOB sob oxigênio limitado e, subseqüentemente, bactérias ANAMMOX convertem o nitrito produzido junto com parte do amônio remanescente a nitrogênio gasoso e pequena quantidade de nitrato é formada conforme as reações apresentadas na Tabela 3.4 (JETTEN *et al.*, 2002).

3.3 Biofilmes

Os biofilmes, acúmulos de células microbianas e produtos celulares em interfaces, são de grande interesse para a biotecnologia. A estrutura destas comunidades varia desde monocamadas de células isoladas dispersas até estruturas complexas, espessas e mucosas de dimensões macroscópicas (biofilmes de filtros biológicos percoladores).

A arquitetura, atividade e função dos biofilmes de diversos ambientes têm sido documentadas e avaliadas utilizando uma ampla variedade de técnicas de microscopia, físico-químicas e de biologia molecular, revelando estruturas tridimensionais complexas. Paralelamente a estas investigações, estão sendo desenvolvidos modelos matemáticos e simulações cada vez mais semelhantes à realidade para explicar o desenvolvimento, estrutura e interações microbianas em biofilmes (WIMPENNY *et al.*, 2000).

3.3.1 Formação e constituição de biofilmes

O desenvolvimento de biofilmes em superfícies é caracterizado por ciclos bacterianos de adsorção, crescimento, adesão e aderência (estabilização da adesão celular), onde os mecanismos de fixação e estabelecimento do biofilme dependem fortemente da comunidade microbiana, das atividades metabólicas e do tipo de material suporte disponível para o desenvolvimento do biofilme (STEWART *et al.*, 1995; THORN *et al.*, 1996). Estes ciclos resultam em estruturas terciárias complexas, como aglomerados de células, espaços intersticiais e canais abertos que são entremeados por fragmentos de substrato gastos (THORN *et al.*, 1996).

As bactérias mantêm contato com a superfície de adesão por meio de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) presentes na superfície dos microrganismos, juntamente a cadeias poliméricas formadas pela decomposição de material celular (algas e bactérias, por exemplo) (Figura 3.3). O desenvolvimento de biofilmes em reatores de crescimento aderido pode ser potencializado pela utilização de materiais suporte com superfícies de contato irregulares, porosas ou providas de interstícios, e, portanto, com maior área superficial de aderência. Estas características são responsáveis pelo aumento da excreção de polissacarídeos por parte dos microrganismos, propiciando as condições perfeitas para o estabelecimento do biofilme (VANDEVIVERE e KIRCHMAN, 1993).

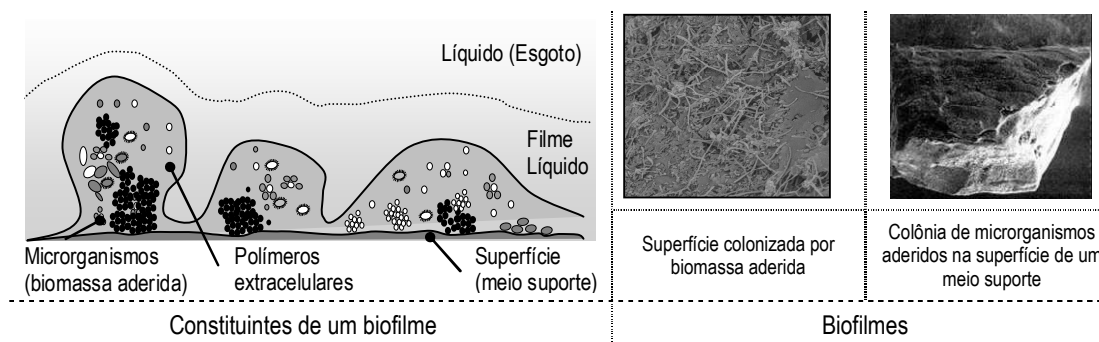


Figura 3.3. Principais componentes de matrizes de origem biológica e estruturas típicas de biofilmes (FLORÊNCIO *et al.*, 2009).

A composição específica de cada biofilme pode variar dependendo dos organismos presentes, de sua situação fisiológica, da natureza do ambiente de crescimento, do tipo de material suporte, das condições físicas prevalentes. O biofilme, em geral, é uma matriz gelatinosa constituída em sua maior parte por água (aproximadamente 97% da massa). A água pode estar ligada às cápsulas das células bacterianas ou pode existir como solvente, cujas propriedades físicas são determinadas pelos solutos dissolvidos no meio (SUTHERLAND, 2001). As células residentes, que podem incluir várias espécies diferentes de microrganismos, representam apenas aproximadamente 5% da matriz. Além de água e células, os outros componentes da matriz incluem EPS (1 a 2%), proteínas - que incluem produtos líticos e enzimas secretadas (1 a 2%), ácidos nucléicos de células lisadas (1 a 2%), íons e ácidos húmicos (em concentrações-traço) do ambiente (ALISSON, 2001).

A estrutura da matriz do biofilme proporciona a formação de aglomerados estáveis com diferentes tipos celulares, levando ao desenvolvimento de um microconsórcio estrutural e de sinergismo. O arranjo espacial dos microrganismos permite a formação de gradientes de nutrientes, gases, aceptores de elétrons, subprodutos metabólicos e pH. Além disso, a formação de habitats anóxicos e anaeróbios em grande proximidade leva ao desenvolvimento de ampla variabilidade de microrganismos, e conseqüentemente, de diferentes processos de eliminação de compostos (ALISSON, 2001).

Em FBP aplicados ao pós-tratamento de efluentes, o biofilme leva 3 a 4 semanas para se estabilizar e ser eficiente na remoção de compostos, durante meses de temperaturas elevadas, e mais de três meses, em baixas temperaturas. O reator somente alcança a total capacidade operacional quando o biofilme já está completamente formado. Em sistemas de biofilmes que tratam esgoto doméstico não é necessário inocular células microbianas, pois os microrganismos que degradam compostos orgânicos e nitrogenados já estão presentes nestas águas residuárias (MAYER *et al.*, 1999).

3.3.2 Composição da comunidade de biofilmes de FBPs

Bactérias aeróbias, facultativas e anaeróbias, fungos, algas, protozoários, rotíferos, flagelados, ciliados, nematódeos, assim como alguns artrópodes em vários estágios de desenvolvimento compreendem a biologia total dos biofilmes de FBPs. Bactérias aeróbias são os organismos predominantes de biofilmes heterotróficos. Elas decompõem a matéria orgânica do esgoto doméstico juntamente às aeróbias, e anaeróbias em biofilmes com depleção de oxigênio. *Acromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Alcaligenes* são espécies encontradas. As bactérias filamentosas *Sphaerotilus natans* e *Beggiatoa* podem ser encontradas na camada

viscosa (METCALF e EDDY, 2003). Em biofilmes autotróficos, bactérias nitrificantes aeróbias como *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* são comumente encontradas. Devido ao crescimento relativamente lento destas bactérias, os biofilmes nitrificantes são geralmente mais finos (< 1 mm) que os heterotróficos, e materiais plásticos com altas áreas superficiais (> 400 m²/m³) podem ser utilizados para enchimento sem causar entupimento do filtro. Em situações de altas cargas orgânicas, o biofilme pode se tornar bastante espesso (> 10 mm), devido à alta disponibilidade de substratos e às condições moderadas de aeração, suficientes para a rápida proliferação de bactérias heterotróficas (WIK, 2004).

Algas, como *Phormidium*, *Chrorella* e *Ulothrix* (HIGGINS e BURNS, 1975), crescem apenas na parte superior dos FBPs, onde a luz solar é disponível e pode ser assumido que têm um efeito marginal no desempenho dos FBPs. Os fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Sporotrichum* e várias leveduras, por outro lado, estabilizam os resíduos, mas seu papel se torna importante em baixos pH em esgotos industriais (LIU e LIPTAK, 2000). Sob certas condições podem causar entupimento do filtro.

Em biofilmes maduros, em estágio avançado de sucessão ecológica, podem estar presentes protozoários (*Vorticella* spp.) e metazoários (rotíferos - *Philodina* spp. e nematódeos - *Diplogaster* spp.). Estes organismos são predadores principalmente de bactérias nitrificantes devido ao seu crescimento lento, afetando negativamente o processo de nitrificação em FBPs (LEE e WELANDER, 1994), sendo que alguns deles predam especificamente determinadas espécies. Griffiths (1989) não encontrou em seus estudos protozoários que predassem especificamente as nitrificantes, e atribuiu este fato ao crescimento das nitrificantes em amplos aglomerados, que dificultam sua ingestão. Entretanto, Verhagen e Laanbroek (1992) encontraram flagelados, que possivelmente devido ao maior tamanho celular das nitrificantes (comparado ao das heterotróficas), predavam especificamente estas bactérias de vida livre. As bactérias nitrificantes tendem a ser muito maiores em tamanho que outras bactérias, por necessitarem de extensas quantidades de membranas respiratórias intracelulares para suas atividades de oxidação. Deste modo, explica-se a forte pressão seletiva dos protozoários bacteriófagos pelas nitrificantes.

Lee e Welander (1994) estudaram em que extensão a eficiência de nitrificação pode ser aumentada pela supressão de predadores (rotíferos e nematódeos). Para tanto utilizaram ciclohexamida e nistatina, substâncias inibidoras de células eucariotas. Após a adição dos inibidores foi observada pronunciada redução no número de rotíferos e nematódeos, os ciliados e flagelados permaneceram inalterados e um grande aumento do número de

aglomerados de bactérias nitrificantes. Este conjunto de fatores pode ter sido responsável pelo aumento considerável da produção de nitrato nos reatores.

3.3.3 Competição entre os microrganismos envolvidos na formação dos biofilmes

A remoção de substrato em reatores de biofilmes é limitada tipicamente pela transferência de massa, e os organismos competem por substratos e espaço dentro do biofilme. Exemplos desta competição em biofilmes incluem a competição de bactérias heterotróficas e nitrificantes autotróficos por oxigênio, aceptor de elétrons comum aos dois grupos (OKABE *et al.*, 1995; RITTMANN *et al.*, 2002), a competição de metanogênicas e redutoras de sulfato por hidrogênio e acetato (RASKIN *et al.*, 1996) e a competição de bactérias anammox e oxidadoras de nitrito por nitrito (HAO *et al.*, 2002). Em alguns casos, a coexistência é desejável, como por exemplo, a coexistência de bactérias heterotróficas e nitrificantes permite a simultânea oxidação de carbono e amônia. Em outros casos, o desafio é prevenir o crescimento de organismos específicos, como no processo SHARON, onde oxidadoras de nitrito são “lavadas” do sistema para evitar a oxidação de nitrito a nitrato (HAO *et al.*, 2002).

Bactérias heterotróficas de crescimento mais rápido têm uma tendência a crescer na superfície do biofilme, ultrapassando o crescimento de autotróficos de crescimento lento. A competição entre bactérias heterotróficas e autotróficas tem sido amplamente estudada em função da carga de substrato orgânico. Para altas cargas de substrato orgânico, a maioria do oxigênio difundido no biofilme é utilizado pelas bactérias heterotróficas que dominam a camada externa do biofilme, e a nitrificação nas camadas mais internas do biofilme pode ser limitada pela viabilidade de oxigênio (ZHANG *et al.*, 1994; OKABE *et al.*, 2004).

A taxa de crescimento de heterotróficos nas camadas mais externas do biofilme, em altas relações C:N (por exemplo, C:N = 1,5), é significativamente mais alta que a de nitrificantes, e isto faz com que os microrganismos heterotróficos substituam os nitrificantes nas camadas mais externas do biofilme. Okabe *et al.* (1996) demonstraram que as bactérias nitrificantes só podem competir com sucesso por oxigênio e espaço em baixas relações C:N (C:N < 1), sendo que nas camadas mais internas os nitrificantes podem competir somente quando ocorre a escassez do substrato orgânico dos heterótrofos. Wijeyekoon *et al.* (2004) verificaram que as concentrações de carbono orgânico mais elevadas em reatores de alta carga (1,2 g-C/m²/dia) suprimiram o potencial de nitrificação. Concluíram que a competição por espaço entre organismos heterótrofos e nitrificantes é um critério limitante para uma nitrificação estável. Os autores afirmam, ainda, que a carga de substrato é um parâmetro crítico na determinação da estrutura e função dos biofilmes.

3.4 Ecologia Microbiana

3.4.1 Breve histórico

Woese e Fox, em 1977, propuseram uma nova classificação para os seres vivos, baseada pela primeira vez em características genéticas e não morfológicas ou celulares, como havia sido até então. A árvore filogenética universal passou a dividir todos os seres vivos em três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*. Woese utilizou, para tanto, novas técnicas para a identificação e classificação dos microrganismos baseando-se no RNA da subunidade menor (16S) do ribossomo, e utilizando catálogos de oligonucleotídeos estabeleceu o grau de similaridade entre as sequências homólogas como critério de distância taxonômica entre organismos distintos. Esse foi um grande avanço para a ecologia microbiana, pois ao contrário do método anterior, baseado em características morfológicas e bioquímicas, e, portanto, menos exato e mais laborioso, o sistema de comparação de sequências faz uso de um critério comparativo entre todos os organismos vivos (o código genético), exibindo uma sensibilidade muito elevada.

Nos últimos anos, os avanços no desenvolvimento e aplicação de técnicas moleculares levaram diversos laboratórios a introduzirem estudos de ecologia molecular na rotina de análise de diversas amostras ambientais. Considerando que grande parte das células bacterianas de ambientes aquático e terrestre (> 99%) não cresce através do cultivo em placas devido à inadequação dos meios de cultura às suas restritas condições nutricionais (AMANN *et al.*, 1990; 1995), foi indispensável o desdobramento de novos métodos (Figura 3.4) baseados na caracterização de ácidos nucleicos para a obtenção de dados mais completos sobre as interações e estruturas de comunidades bacterianas em amostras ambientais (ROSADO e DUARTE, 2002).

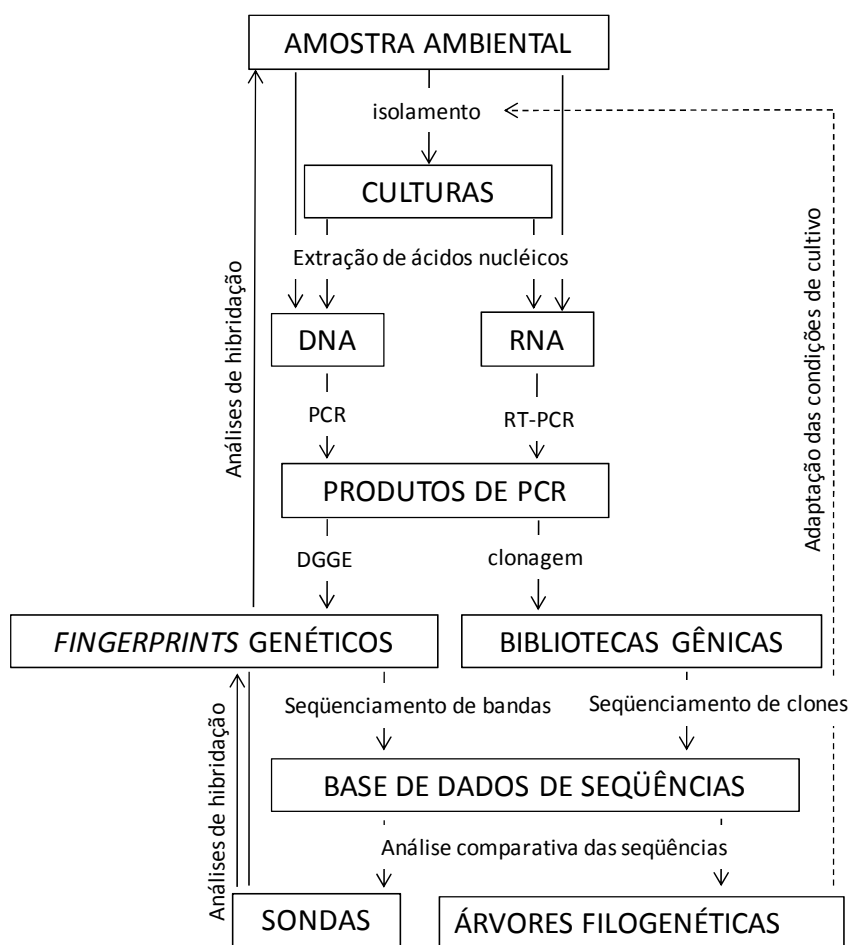


Figura 3.4. Fluxograma dos diferentes passos no estudo da estrutura e função de comunidades microbianas em amostras ambientais. Modificado de Muyzer e Smalla (1998).

A disponibilidade de um grande número de seqüências de DNAr 16S depositadas em um banco de dados (*Ribosomal Data Bank Project*) tem permitido que essa informação molecular seja amplamente utilizada para o agrupamento filogenético. No entanto, a associação entre estrutura da comunidade com sua atividade e funcionalidade nos sistemas ambientais constitui o foco central de estudo da ecologia microbiana.

A amplificação de seqüências do gene que codifica o RNAr 16S por PCR promoveu uma autêntica onda de trabalhos no campo da ecologia molecular (AMANN *et al.*, 1995; MUYZER e SMALLA, 1998). Foi introduzida a idéia de que qualquer ecossistema pode ser caracterizado utilizando o RNAr 16S como marcador filogenético e “impressão digital” dos microrganismos presentes. Para tanto, se extrai o DNA genômico total da amostra, que inclui a informação genética de todos os membros da comunidade microbiana em observação, e se amplifica uma parte ou o gene inteiro que codifica o RNAr 16S. Em seguida, são utilizados *primers* da especificidade desejada (para β -*Proteobacteria*, por exemplo) ou grupo-específicos (domínio *Bacteria* ou *Archaea*, por exemplo), de maneira que se obtém uma

mistura complexa de cópias desse gene. As duas técnicas principais que permitem separar essa mistura de genes e obter as informações genéticas e evolutivas nela contidas são DGGE e clonagem (SANZ e KÖCHLING, 2007).

A molécula RNAr 16S é considerada um “relógio evolutivo”, dada sua universalidade e abundância em todos os seres vivos (10^3 a 10^5 ribossomos/célula) e pelo fato de que é uma molécula altamente conservada ao longo da evolução, embora apresente algumas regiões altamente variáveis. Isto permite a comparação entre organismos do mesmo domínio, assim como a diferenciação de linhagens da mesma espécie, respectivamente, o que permite o desenho de *primers* de PCR e sondas (FISH) de qualquer especificidade filogenética. Além disso, o tamanho do gene que codifica o RNAr 16S é adequado tanto do ponto de vista estatístico como prático, uma vez que se pode amplificá-lo e seqüenciá-lo inteiramente por PCR sem dificuldades.

3.4.2 Estudo da diversidade microbiana

A diversidade ou a variedade e abundância das espécies em diferentes habitats são temas centrais da ecologia microbiana há vários anos. Atualmente, o termo diversidade engloba a organização biológica como um todo, abrangendo do nível molecular ao global. Sendo assim, a diversidade pode ser considerada como a quantidade e a distribuição da informação genética dentro das comunidades naturais (OVREAS e TORSVIK, 1998), podendo ser medida em diferentes níveis de complexidade, ou seja: diversidade genética, diversidade de espécies e de ecossistemas (GILPIN *et al.*, 1992). É importante salientar que todas são consideradas de igual importância para o futuro dos estudos de novas tecnologias e melhoramentos de sistemas de tratamento de esgotos, e que a investigação da biodiversidade é importante por determinar, basicamente, a funcionabilidade e a estabilidade dos ecossistemas.

A diversidade genética envolve a variabilidade natural dos genes de organismos individuais e coletiva, referente aos genes dos membros de uma população, linhagem, raça ou espécie. Vale ressaltar que uma população estável pode ser caracterizada pela diversidade genética de seus membros, sendo esta variabilidade que determina o sucesso de uma determinada população frente à ampla gama de variações das condições ambientais (concentrações de matéria orgânica e nutrientes, pH, alcalinidade) e de mudanças que ocorrem com o tempo (GILPIN *et al.*, 1992) (entupimento dos filtros devido ao espessamento do biofilme, por exemplo).

O pronunciado aumento da produção científica sobre as relações entre diversidade genética e funcionamento de microrganismos colocou em ênfase os estudos relacionados a espécies

importantes que apresentam vias metabólicas de remoção de compostos tóxicos, que resistem a condições extremas, a mudanças bruscas na composição de esgoto doméstico, características estas que os capacitam de ser utilizados em diversos processos de biorremediação. Os autores têm um consenso de que mudanças na composição ou atividade da comunidade microbiana podem levar a efeitos imediatos e permanentes no funcionamento dos sistemas (PERRY *et al.*, 1989).

De acordo com Magurran (1988), a dificuldade de se definir diversidade reside no fato de se constituir, basicamente, de dois componentes: variedade e abundância relativa das espécies. Por conseguinte, a diversidade pode ser medida pelo registro do número de espécies, pela descrição de sua abundância relativa ou pelo uso de uma medida que combine estes dois componentes.

A incorporação destes dois componentes na obtenção dos índices de diversidade tem desencadeado muitos debates entre os estudiosos, pois os dados obtidos podem ser interpretados, diferentemente, dependendo dos cálculos usados para sua obtenção (JAMES e RATHBURN, 1981). Enquanto muitos estudiosos têm calculado os índices de diversidade, tais como Shannon ou de Simpson (MAGURRAN, 1988), para plantas e animais em ecossistemas particulares, a ligação com a biodiversidade está longe de ser evidente ou realística dentro de uma dimensão maior de conhecimentos. Na medida em que a biodiversidade é vista como uma medida de qualidade ambiental, é presumível que, para sua avaliação, se utilizem diferentes aproximações, métodos e indicadores.

Odum (1988) considerou que a diversidade de espécies pode ser expressa com base em duas abordagens. A primeira emprega curvas de abundância relativa do componente dominância da diversidade (WHITTAKER, 1965) e a segunda utiliza índices de diversidade, constituídos por proporções ou outras expressões matemáticas das relações de importância das espécies. Sabe-se que os índices de diversidade são expressos por um único número, que pode representar a redução ou a abundância de um conjunto complexo de táxons. Segundo Mahafee e Kloepper (1997), o fato de se utilizar um único número para representar uma determinada situação é vantajoso, pois facilita a comparação em experimentação, assim como possibilita a elucidação de mudanças que ocorrem nas comunidades relacionadas. Kennedy e Smith (1995) consideraram que os índices, embora não representem a composição total de uma comunidade, permitem dimensionar a riqueza, a igualdade e a diversidade nos diferentes ambientes estudados.

Sabe-se que os índices são usados como descritores da diversidade há muito tempo, havendo atualmente, uma ampla gama destes que avalia a diversidade sob diferentes aspectos, tais como: similaridade (dados qualitativos e quantitativos), diversidade específica, diversidade de dominância e de riqueza aparente, como também de equitatividade e dominância (ROSSO, 1996). Considera-se o coeficiente de Jaccard, desenvolvido em 1908, como o mais antigo e natural dos índices, sendo possível estimar, por sua equação, a diversidade em termos de espécies presentes e ausentes no sistema, constituindo-se desta forma numa medida de similaridade qualitativa.

Devido ao grande número de índices e modelos disponíveis é geralmente difícil escolher qual é o mais adequado para se medir a diversidade. Rosso (1996) reportou que uma das diferenças entre os índices reside na importância atribuída às co-ausências e co-presenças. Coletivamente, a literatura discute que cada método tem seus pontos fortes e fracos e considera que nenhum é ideal para expressar a diversidade (MAHAFFEE e KLOEPPER, 1997). A utilização de diferentes métodos é considerada por estes pesquisadores como uma alternativa adequada, por possibilitar a obtenção de informações complementares, que levam a uma melhor avaliação da estrutura e diversidade das comunidades estudadas. Kempton (1979) reportou que a distribuição de abundância de espécies é, frequentemente, uma medida mais sensível as alterações ambientais do que a medição simples da riqueza de espécies, pois expressa, mais adequadamente, a organização da comunidade como um todo. Embora este questionamento tenha fundamento, os índices que expressam a riqueza de espécies são os mais empregados nos trabalhos de diversidade.

O índice de Shannon, já tradicionalmente designado como índice de Shannon, é a medida de diversidade mais consagrada. Para Wihlm (1972), esta equação é a mais satisfatória dentre as desenvolvidas para diversidade específica e de dominância, pois expressa a importância relativa de cada espécie e não apenas a proporção entre espécies e indivíduos. Odum (1988) reportou que este é o índice que atribui um maior peso a espécies raras, prevalecendo, desta forma, o componente de riqueza de espécies. O índice de Shannon também assume que os indivíduos são amostrados ao acaso de uma população indefinidamente grande e que todas as espécies estão representadas na amostra coletada, sendo relativamente independente do tamanho da amostra. Segundo Hutcheson (1970) os dados obtidos se enquadram numa distribuição normal, desde que N seja um número inteiro, de modo que os métodos estatísticos podem ser empregados para testar a significância das diferenças entre as médias.

3.4.3 Técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da ecologia microbiana

3.4.3.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR. Essa técnica desenvolvida por Saiki *et al.* (1985) permite amplificar pequenos e específicos fragmentos do genoma, permitindo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinadas regiões do DNA. Como a reação de PCR é específica, pode-se obter a amplificação de seqüências-alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de seqüências, permitindo a detecção de organismos específicos em misturas heterogêneas.

A reação de PCR se inicia com uma etapa de desnaturação, onde as amostras são aquecidas a 94-96°C por um a vários minutos para separar as fitas do DNA. Logo após, a temperatura é abaixada para 56-65°C por um a vários minutos, para ocorrer o anelamento (pareamento de bases) dos *primers* (seqüências iniciadoras complementares à de interesse) *forward* e *reverse* com as seqüências complementares ao fragmento alvo. Em seguida a temperatura é aumentada para 72°C e sucede a extensão (síntese) do fragmento de DNA a partir dos *primers* e desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), pela ação de uma DNA polimerase termoestável, como por exemplo, a *Taq* DNA polimerase. O ciclo desnaturação-anelamento-extensão é repetido várias vezes, permitindo a amplificação exponencial da seqüência de interesse (SAIKI *et al.*, 1985).

Usualmente, dependendo do objetivo do estudo, após a reação de PCR com *primers* específicos para genes funcionais ou RNAr 16S se faz necessária uma etapa adicional para separar os fragmentos multiplicados de mesmo número de pares de bases, porém seqüências distintas. Dentre as técnicas empregadas para tal fim, serão descritas com ênfase a DGGE e clonagem, utilizadas nesta pesquisa.

A PCR vem sendo utilizada com freqüência no estudo de comunidades específicas de sistemas de tratamento de esgotos (SANZ e KÖCHLING, 2007), como por exemplo, das bactérias nitrificantes. Purkhold *et al.* (2000) utilizaram a PCR com *primers* específicos para estudar 6 ETEs operando com o sistema de lodos ativados e 5 com reatores de biofilmes, e reunindo resultados filogenéticos sobre as AOB, aperfeiçoou a estrutura filogenética de AOB existentes, utilizando seqüências quase completas de RNAr 16S e seqüências parciais de genes *amoA*. Este trabalho resultou na formação de sete *clusters* gerais de AOB, que podem servir como molde para a construção de relações entre AOB já descritas e as descobertas recentemente. Além da detecção de grupos específicos da β -subdivisão das oxidadoras de

amônia em sistemas de tratamento de esgotos, estes estudos permitiram a correlação de sua presença com dados físico-químicos das águas residuárias (KOWALCHUK *et al.*, 1997).

3.4.3.2 PCR-clonagem

Após a realização da reação de PCR como descrita acima, a clonagem é uma boa alternativa para a separação de distintas seqüências com mesmo tamanho de pares de bases. As distintas cópias do gene amplificado (neste trabalho, 1490 pares de bases) são inseridas em um vetor plasmidial, que utilizamos para transformar uma cepa bacteriana competente (normalmente células de *Escherichia coli* permeabilizadas). Em seguida procede-se o cultivo da bactéria que após sucessivas divisões celulares gera um elevado número de cópias deste plasmídeo com o gene inserido. Isto garante que cada colônia de bactérias contenha uma só variante do gene clonado. No passo seguinte isola-se o DNA plasmidial e se determina a seqüência do gene inserido. O conjunto de todos os clones ou das preparações do DNA plasmidial forma uma biblioteca de genes (*gene library*), que representa, de maneira aproximadamente completa, a comunidade bacteriana da amostra de interesse. As seqüências obtidas, a seguir, são comparadas às de uma base de dados conhecida, sendo as mais utilizadas: NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*).

Para estabelecer a afiliação filogenética dos membros da comunidade microbiana observada, são utilizadas as seqüências obtidas, as distâncias entre elas (graus de similaridade) e as seqüências de uma base de dados como critério determinante. Quanto maior a similaridade entre as duas seqüências, mais próximos se encontram ambos os táxons, do ponto de vista evolutivo. Vários modelos matemáticos são aplicados para o cálculo de distâncias genéticas, sendo os mais empregados: método por máxima parsimônia (*Maximum Parsimony*), vizinho mais próximo (*Neighbor Joining*) e máxima probabilidade (*Maximum Likelihood*) (KÖCHLING, 2007).

O método de amplificar, clonar e seqüenciar permite obter uma imagem bastante completa da microbiota de um ecossistema, refletindo as relações filogenéticas dos microrganismos com alta precisão. Esta metodologia tem sido extensivamente aplicada na criação de inventários de vários ambientes (KOWALCHUK *et al.*, 1998; PURKHOLD *et al.*, 2000), e foi a metodologia que levou à identificação de sete *clusters* de seqüências de RNAr 16S da β -subclasse das AOB.

Entretanto, para realizar um estudo confiável da diversidade microbiana, englobando a maioria dos microrganismos presentes na amostra de interesse, é necessário analisar um

número elevado de clones. Um inconveniente importante da técnica PCR-clonagem é o consumo de tempo e dedicação que exige, já que todos os passos do protocolo são muito laboriosos. Por este fato, a clonagem de seqüências de RNAr 16S deve ser empregada principalmente quando se trata de número limitado de amostras. Para estudar a evolução da biomassa em um sistema ao longo do tempo ou da resposta de uma comunidade microbiana a mudanças de fatores físico-químicos ou nutritivos seria conveniente dispor de um método mais aplicado a números de amostras mais altos, tal como o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

3.4.3.3 PCR-DGGE

A técnica do DGGE consiste na realização de uma eletroforese em gel de gradiente desnaturante, que permite a separação de moléculas de DNA de mesmo tamanho, mas de distinta seqüência de nucleotídeos ao longo de um gradiente de desnaturação química. A separação está baseada na decrescente mobilidade eletroforética de moléculas de DNA fita dupla parcialmente desnaturadas em géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturantes de DNA (solução de uréia e formamida) (MUYZER e SMALLA, 1998). O ponto de desnaturação depende da estrutura primária de cada molécula de DNA, já que em uma dupla hélice, os enlaces de três pontes de hidrogênio entre guanina e citosina têm mais estabilidade, quando comparados aos enlaces de duas pontes entre timina e adenina. Em outras palavras, a separação eletroforética neste caso irá depender da quantidade de G+C presente em cada molécula de DNA (MUYZER *et al.*, 1993). Para prevenir a completa dissociação das duas fitas de DNA, é comum a adição de uma seqüência de 30-50 nucleotídeos GC na extremidade 5' de um dos *primers* utilizados na PCR.

Após a PCR, os amplicons são inseridos no gel de DGGE como moléculas de fita dupla e à medida que migram ao longo do gradiente crescente de uréia e formamida, as condições desnaturantes se tornam cada vez mais fortes. Sendo assim, cada produto de PCR com uma seqüência distinta desnatura em uma diferente posição. Uma vez alcançada a concentração ideal de desnaturação, ocorre a transição de fita dupla para uma molécula parcialmente desnaturada, e esta pára de migrar em uma determinada posição do gel.

O método foi desenvolvido por Fischer e Lerman (1979) e desde então sofreu muitas mudanças, melhoras e adaptações para seu uso em diferentes campos de pesquisa. O uso da DGGE permitiu observar a evolução de comunidades microbianas ao longo do tempo, em resposta a mudanças de condições fisiológicas/químicas ou de operação de um reator, ou na

comparação entre amostras procedentes de diferentes reatores ou ambientes (TESKE *et al.*, 1994; MUYZER e SMALLA, 1998; ROWAN *et al.*, 2003).

Desenvolvido inicialmente para pesquisas relacionadas com a detecção de mutações em genes humanos (FINKELSTEIN *et al.*, 1990), a introdução no setor da ecologia microbiana chegou com Muyzer e colaboradores (MUYZER *et al.*, 1993). O grupo estudou biofilmes de sistemas de tratamento de esgotos aeróbios e anaeróbios, gerou géis de DGGE que apresentavam *fingerprints* característicos e identificou vários microrganismos mediante a hibridação das bandas em questão com sondas genéticas marcadas com compostos radioativos. Hoje em dia é mais comum a excisão de bandas do gel, seguida de sua reamplificação por PCR, purificação e finalmente o seqüenciamento, o que permite identificar o microrganismo de forma mais exata e fácil do que a variante que usa sondas radioativas.

De toda maneira, os passos adicionais de excisão e seqüenciamento de bandas em um gel de DGGE significam um aumento adicional de trabalho que, dependendo do enfoque do estudo, pode ser omitido. Esse é o caso, por exemplo, se o que se deseja é somente comparar a composição da comunidade microbiana refletida por *fingerprints* entre várias amostras. Se o requerido é a identificação das espécies da amostra, há que ter em conta a possibilidade de seqüenciamento de bandas, que em todo caso é um processo mais rápido que a clonagem.

Devido ao menor tamanho dos produtos de PCR, a informação filogenética que as bandas seqüenciadas de DGGE oferecem é menos exata do que a dos clones, que possuem aproximadamente 1.500 pares de bases (domínio *Bacteria*). A principal vantagem desta técnica é a relativa facilidade de processar e comparar um elevado número de amostras, o que é possível pelo método de PCR – clonagem, porém mais caro e trabalhoso.

3.4.3.4 Hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH)

A hibridação *in situ* com sondas de RNAr 16S marcadas com fluorocromos (por exemplo, Cy3) (*Fluorescent in situ Hybridization*, FISH) completa o conjunto de três importantes técnicas utilizadas em ecologia microbiana. Na técnica FISH o RNAr 16S das células-alvo presentes na amostra hibrida com uma sonda de seqüência complementar marcada com o composto fluorescente, que permite a visualização direta da amostra hibridada em um microscópio de fluorescência ou em um microscópio confocal a laser (AMANN *et al.*, 1990; 1995).

Este método oferece a possibilidade de quantificar os microrganismos presentes em uma dada amostra, o que representa uma vantagem em comparação com a clonagem e o DGGE, já que estas não são quantitativas. Outra vantagem importante desta técnica é a possibilidade de estudar uma comunidade microbiana em suas condições naturais (*in situ*), mantendo a estrutura das colônias e a situação relativa das bactérias em comparação a outros microrganismos presentes na amostra. Em amostras que possuem uma estrutura espacial em 3D, como é o caso dos biofilmes ou em ambientes complexos como lodo granular anaeróbio, essa informação pode ser de grande importância (KÖCHLING, 2007).

Se combinada com a microscopia confocal a laser de varredura, a técnica FISH pode ser aplicada para elucidar a distribuição espacial e as relações estrutura/função de comunidades bacterianas específicas em biofilmes. A quantidade de bactérias nitrificantes e sua atividade fisiológica em reatores para o tratamento de esgotos são consideradas parâmetros limitantes para a bioconversão de nitrogênio no esgoto. Desde que a presença de bactérias nitrificantes pode ser correlacionada às suas atividades características, a comparação da contagem utilizando sondas fluorescentes às respectivas taxas de nitrificação sustenta a base para avaliar sistematicamente as contribuições de espécies descritas na literatura neste processo em sistemas de engenharia e no meio ambiente (WAGNER *et al.*, 1995; MOBARRY *et al.*, 1996). Adicionalmente, a quantificação de AOB e NOB nos biofilmes por hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) supre informações adicionais sobre o desempenho de reatores, considerando a remoção de amônia.

As três principais técnicas moleculares aplicadas à Ecologia Microbiana se compreendem melhor como um jogo completo para descrever um ecossistema de interesse, como métodos complementares e não exclusivos. Com a clonagem se podem encontrar novas espécies e realizar estudos filogenéticos muito detalhados, enquanto a DGGE permite obter uma vista global sobre uma população microbiana em pouco tempo, e é aplicável a números elevados de amostras. As técnicas de hibridação *in situ* completam a caixa de ferramentas do ecólogo microbiano com a opção de levar a cabo não somente análises quantitativas como também observar a disposição espacial de microrganismos em macroestruturas. Exemplos para a combinação hábil de diferentes metodologias estão presentes nos estudos de Juretschko *et al.* (2002) sobre a comunidade microbiana de um sistema de nitrificação/desnitrificação de águas residuárias ou nas investigações de Watanabe *et al.* (2000), onde utilizaram as três técnicas em conjunto descrevendo um consórcio microbiano em águas contaminadas por petróleo. Díaz *et al.* (2006) estudaram com grande detalhamento o lodo granular de um reator UASB

empregado na depuração de águas residuárias de cervejaria. No estudo esclarecem características de sua estrutura microscópica, da organização dos microrganismos no meio suporte e também aspectos funcionais do lodo analisado. Tudo isso foi possível pela aplicação complementar de várias técnicas de biologia molecular descritas: DGGE, clonagem e FISH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição do Aparato Experimental

O aparato experimental foi instalado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado na ETE Arrudas (Estação de Tratamento de Esgoto da cidade de Belo Horizonte – MG). O CePTS compreende vários tipos diferentes de unidades de tratamento em escala piloto e de demonstração, todas alimentadas com esgoto sanitário. Os filtros biológicos percoladores utilizados na pesquisa foram dimensionados para realizar o pós-tratamento dos efluentes de um reator UASB (Figura 4.1A). O reator anaeróbico foi projetado para tratar o esgoto de uma população equivalente a 500 habitantes (volume útil de 22 m³) e foi operado em um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 7 horas e carga orgânica volumétrica (COV) de 1,7 kgDBO/m³.d.



Figura 4.1. Aparato experimental utilizado na pesquisa: sistema UASB/FBP. A) Reator UASB; B) FBP; C) Visão superior dos FBP - materiais suporte.

O FBP (Figura 4.1B) foi dividido em quatro compartimentos, cada um preenchido por materiais suportes de características distintas: escória de alto-forno nº 4, anéis plásticos randômicos, sistema *Downflow Hanging Sponge* (DHS) e aparas de conduíte corrugado 1” (Figura 4.1C). A Tabela 4.1 mostra as características principais do FBP.

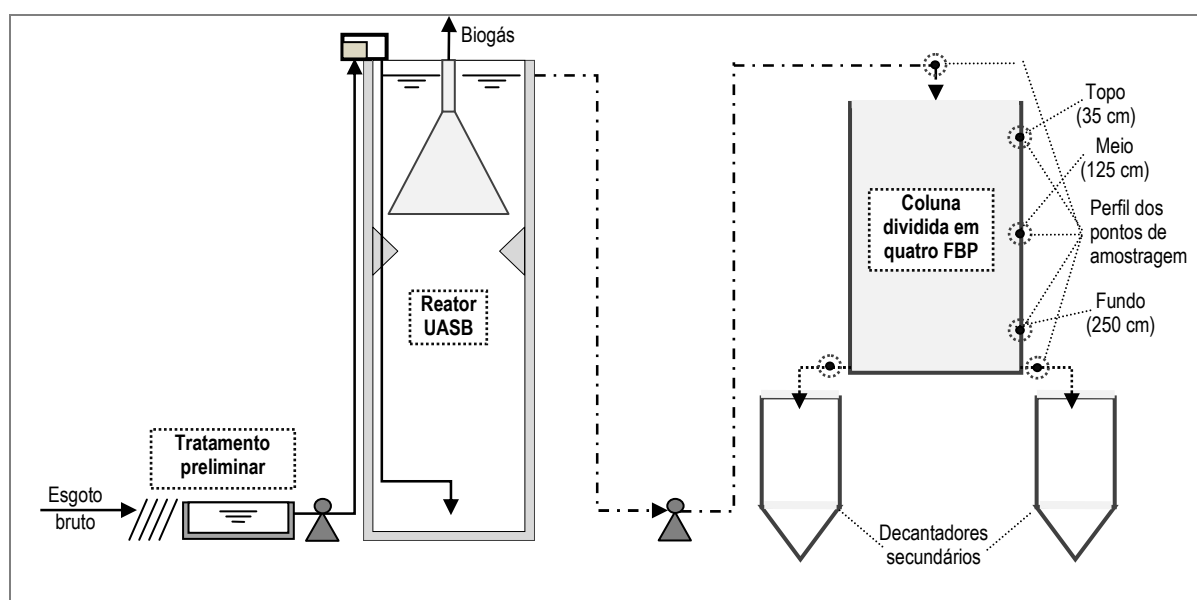
Tabela 4.1. Principais características do FBP e dos materiais de enchimento investigados.

Características	Filtro Biológico Percolador			Materiais de enchimento
	Compartimento reacional total	Compartimento individualizado	Decantadores secundários	Área superficial específica (m ² /m ³)
Diâmetro (m)	2,10	-----	1,00	Escória de alto forno: 60
Área útil (m ²)	3,46	0,87	0,79	Anéis plásticos: 80
Altura útil (m)	2,50	2,50	1,82	DHS (Downflow hanging sponge) ¹ : 80
Volume útil (m ³)	8,65	2,16	1,44	Aparas de conduíte ² : 220

¹ O DHS é constituído de séries de cortinas plásticas verticais (dispostas lado a lado), nas quais diversas secções triangulares de esponjas são coladas. Mais detalhes estão descritos em Machdar *et al.* (2000).

² O conduíte é constituído de tubulação elétrica de polipropileno (diâmetro de 1") cortada em pedaços de 3cm.

Durante a pesquisa, o efluente do reator UASB foi distribuído no topo dos FBPs, como ilustrado na Figura 4.2. Os perfis de parâmetros físico-químicos foram avaliados a partir da coleta de amostras da fase líquida em 5 (cinco) diferentes pontos: afluente ao FBP, três pontos de coleta em três 3 alturas ao longo dos FBP e efluente do FBP. A determinação da concentração de N-amoniaco foi realizada semanalmente e das concentrações de nitrato e nitrito quinzenalmente em toda a duração de cada fase operacional. A amostragem de material para as análises microbiológicas ao longo das alturas dos FBP, em cada compartimento reacional foi realizada em três pontos (topo: 35 cm; meio: 125 cm; fundo: 250 cm). A Figura 4.2, extraída de Almeida (2007), mostra o fluxograma das unidades que compõem o sistema UASB/FBP, bem como a identificação dos pontos de amostragem da fase líquida e do meio suporte para extração do biofilme.

**Figura 4.2.** Fluxograma do aparato experimental e identificação dos pontos de amostragem (ALMEIDA, 2007).

A Tabela 4.2 apresenta as características operacionais impostas aos FBP e período de monitoramento das três fases investigadas neste trabalho.

Tabela 4.2. Características operacionais impostas aos FBP e período de monitoramento.

Fases	Filtro biológico percolador					Período de desenvolvimento da fase operacional
	¹ TAS (m ³ /m ² .d)	² Vazão média (m ³ /d)	³ COV aplicada (kgDBO/m ³ .d)	Relação DBO/NTK média (Efluente UASB)	Concentração afluente média de amônia (mg/l)	
1	10,0	34,6	0,24	1,86	22	Fevereiro a Maio de 2007
2	15,0	52,0	0,37	1,38	38	Junho a outubro de 2007
3	10,0	34,6	0,38	2,25	32	Maio a novembro de 2008*

* O objetivo de realização da fase 3 foi avaliar o desempenho do sistema em época do ano em se observa uma maior concentração dos constituintes no esgoto bruto. Durante a fase operacional 3, houve interrupções de operação.

¹ TAS = Taxa de aplicação superficial (m³/m².d); ² Vazão média afluente a ser bombeada para o FBP nas respectivas fases em função da TAS fixada; ³ COV aplicada = Carga Orgânica Volumétrica aplicada (kgDBO/m³.d).

4.2 Coleta e preparo das amostras

Foram realizadas três coletas de materiais suporte para extração e análises microbiológicas dos biofilmes. A primeira quando o FBP estava em seu 122º dia operacional em uma COV de 0,24 kgDBO/m³.d. (fase 1), a segunda coleta aproximadamente um ano depois, em COV de 0,37 kgDBO/m³.d. (fase 2) e a terceira coleta foi efetuada no fim da fase 3, oito meses após o fim da fase 2. As amostras dos materiais suporte (Figura 4.3) foram coletadas da superfície (topo) e em aberturas (escotilhas) nas laterais de cada compartimento do FBP (meio e fundo), adicionadas a frascos de plástico de 500 mL estéreis e transportadas para laboratório em isopor com gelo.



Figura 4.3. Biofilmes aderidos aos materiais suporte (seta vermelha). A) escória de alto-forno; B) anéis plásticos; C) DHS (*Downflow Hanging Sponge*); D) aparas de conduíte.

A cada frasco completamente preenchido com materiais suporte foram adicionados 100 mL de tampão fosfato PBS 1X (130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄, pH 7,2 – 7,4). Os biofilmes foram extraídos por meio de agitação manual por aproximadamente 2 minutos, e o que não foi removido neste procedimento foi extraído com uma espátula estéril. Parte dessa suspensão foi utilizada para o preparo das lâminas para as análises morfológicas qualitativas e 375 µL foram fixadas em 1.125 µL de solução de paraformaldeído 4% segundo protocolo de

AMANN *et al.* (1990) e armazenadas a -20°C para as análises de hibridação *in situ*. Aproximadamente 2g deste material suspenso em PBS foram recuperados por centrifugação (peso seco/úmido) e armazenados a -20°C para extração de DNA. O trabalho foi executado de acordo com esquema apresentado na Figura 4.4.

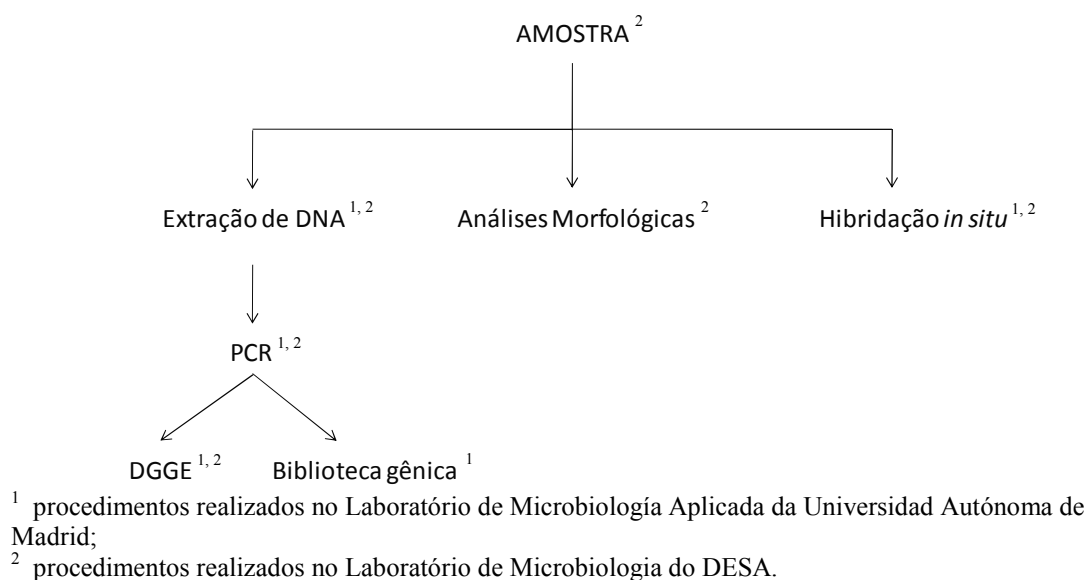


Figura 4.4. Esquema de trabalho ilustrando as principais etapas experimentais utilizadas para identificação e quantificação dos microrganismos nos FBP nas três fases de operação.

4.3 Análises morfológicas

As observações das morfologias dos organismos presentes nos biofilmes dos diferentes materiais suporte e profundidades foram realizadas mediante microscopia de contraste de fase em um microscópio *Zeiss Axiostar plus*. As imagens foram capturadas com câmera digital *Canon Power Shot A95* e processadas com o software *Axio Vision 4.4*.

4.4 Análises de biologia molecular

4.4.1 Hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH)

Os protocolos descritos por Amann *et al.* (1990, 1995) foram usados para a realização da técnica FISH. As especificidades das sondas utilizadas foram compatíveis com as seqüências depositadas na página web *Ribosomal DataBase Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>).

Para a hibridação, um total de $5\mu\text{L}$ da amostra fixada foi aplicado em uma lâmina de 8 “pocinhos” ($75\times 25\text{mm}$, com “pocinhos” de 5mm de diâmetro) (Superior, Marienfeld, Alemanha), seco por 20 min a 46°C e subseqüentemente desidratado em soluções de 50%, 80% e 100% de etanol por 3 min cada. As reações de hibridação foram realizadas adicionando $8\mu\text{L}$ de tampão de hibridação (a porcentagem de formamida –FA- depende da sonda utilizada)

(Tabela 4.3) e 1µL da sonda marcada com Cy3 (em concentração de 50 ng/µL) em cada “pocinho”. No caso da hibridação com as sondas Ntspa662 e NIT3, quantidades equimolares dos respectivos competidores não-fluorescentes (50ng/µL) foram adicionadas à reação de hibridação (Tabela 4.3) por suprimirem completamente as hibridações inespecíficas de cada sonda. A hibridação foi conduzida por duas horas a 46°C em um forno de hibridação (*Hybridization Oven*, Ecogen, Barcelona, Espanha). A seguir à hibridação, uma etapa de lavagem foi realizada por 15 min a 48°C em tampão com a concentração de NaCl apropriada para cada sonda (Tabela 4.3). A sonda NON338 foi usada como controle negativo.

As amostras hibridadas foram observadas em um microscópio de epifluorescência invertido (Zeiss Axiovert 200) e quantificadas manualmente. Os números absolutos de células marcadas pelas sondas foram determinados mediante cálculo da média das contagens de 10 campos visuais corrigidas pelo fator de diluição de cada amostra (amostras: bruta, diluída 6X e 12X) e pelo peso de cada amostra de biofilme extraído. Os resultados foram expressos em células por µL mais ou menos o desvio-padrão. Os cálculos das abundâncias relativas foram realizados frente ao percentual de células marcadas pelas sondas e o número de células totais determinadas pela coloração com DAPI 1mg/mL (4',6 - diamidino-2-fenilindol).

Tabela 4.3. Sondas e condições de hibridação utilizadas para FISH.

Sondas	Seqüências (5'→ 3')	Especificidades	* FA (%)	NaCl (mM)	Referências
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	35	80	Amann <i>et al.</i> (1990)
NON338	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Controle negative			Wallner <i>et al.</i> (1993)
Nso190	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	β-proteobacteria oxidadoras de amônia	25	159	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Nso 1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	Quase todas β-Proteobacteria oxidadoras de amônia	35	80	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Ntspa662	GGAATCCGCGCTCCTC T	<i>Nitrospira</i>	35	80	Daims <i>et al.</i> (2000)
CNtspa662	GGAATCCGCTCTCCTCT	Competidor para Ntspa662	-	-	-
NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	<i>Nitrobacter sp.</i>	25	159	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
CNIT3	CCTGTGCTCCAGGCTCCG	Competidor para NIT3	-	-	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
TBD 121	CTCGGTACGTTCCGACGC	<i>Tb. denitrificans</i> ; <i>Tb. Thioparus</i>	20	225	Fernández <i>et al.</i> (2007)
Amx 820	AAAACCCCTCTACTTAGTGCC C	“Brocadia anamnoxidans” e <i>Cand.</i> “Kuenenia stuttgartiensis”	40	56	Schmid <i>et al.</i> (2000)

* FA = % de formamida utilizada na reação de hibridação.

4.4.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com o kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit*, conforme protocolo descrito no kit. O tamanho do DNA genômico purificado foi comprovado mediante eletroforese em um gel de agarose 1% e amplificado por PCR, cujos procedimentos estão descritos abaixo.

4.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Os ácidos nucléicos, tais como extratos de DNA genômico e produtos de PCR, foram analisados mediante eletroforese horizontal. Para isto foram preparados géis de agarose 1% em TBE 0,5X (89 mM Tris base, 89 mM Ácido bórico, 2,0 mM EDTA, pH 8,0). Para determinar o peso molecular e a concentração do DNA foram utilizados os marcadores de peso molecular de concentrações definidas: ϕ 29 digerido com a enzima *Hind III* (4370 pb - *Centro de Biología Molecular – Universidad Autónoma de Madrid*) e *Gene Ruler 1kb DNA Ladder* (Fermentas Life Sciences, Belo Horizonte – MG). Os géis foram corados com brometo em etídio (1 μ g/mL) por 10 min., lavados em água destilada (10 min.) e logo depois observados à luz ultravioleta, com a finalidade de comprovar o tamanho, a quantidade e a pureza da amostra de DNA.

4.4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Alíquotas do DNA genômico extraído foram utilizadas em várias diluições como molde para a PCR. Para a DGGE foi utilizado o par de *primers* 341F-GC/907R e para clonagem 27F/1492R (Tabela 4.4). Para reamplificação de bandas do gel de DGGE, foi utilizado o mesmo par de *primers*, porém, sem a cauda GC.

Tabela 4.4. *Primers* utilizados para a PCR

Primer	Alvo	Seqüência (5' → 3')	Referência
341F ^a	RNAr 16S/ <i>Bacteria</i>	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
907R	Universal	CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT	Muyzer <i>et al.</i> , 1998
27F	RNAr 16S/ <i>Bacteria</i>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, 1991
1492R	Universal	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991

Código IUB (*Internacional Union of Biochemistry*): M = A, C; Y = T, C

a) para a DGGE, uma seqüência rica em GC foi unida à extremidade 5' do *primer*:
5'-CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG-3'

Cada reação de amplificação continha o tampão PBS 1X (Isogen, Ijsselstein, Países Baixos), 0,25 mM dNTPs, 0,5 μ M de cada *primer* (Isogen, Ijsselstein, Países Baixos) e 1,5U de *Taq* polimerase (Phoneutria, Brasil). Para cada diferente par de *primers* se ajustou a concentração

de Mg^{2+} na reação e as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão nos programas do termociclador (*GeneAmp PCR System 2400*, Perkin Elmer, Wellesley, MA, Estados Unidos). Cada programa consistiu em um passo inicial de desnaturação do DNA a 94°C, seguido de um número de ciclos de amplificação adaptado a cada combinação de *primers* e, no caso da clonagem, um passo adicional de extensão de 10 min. a 72 °C para garantir a síntese completa das cópias de DNA iniciadas (Figura 4.5).

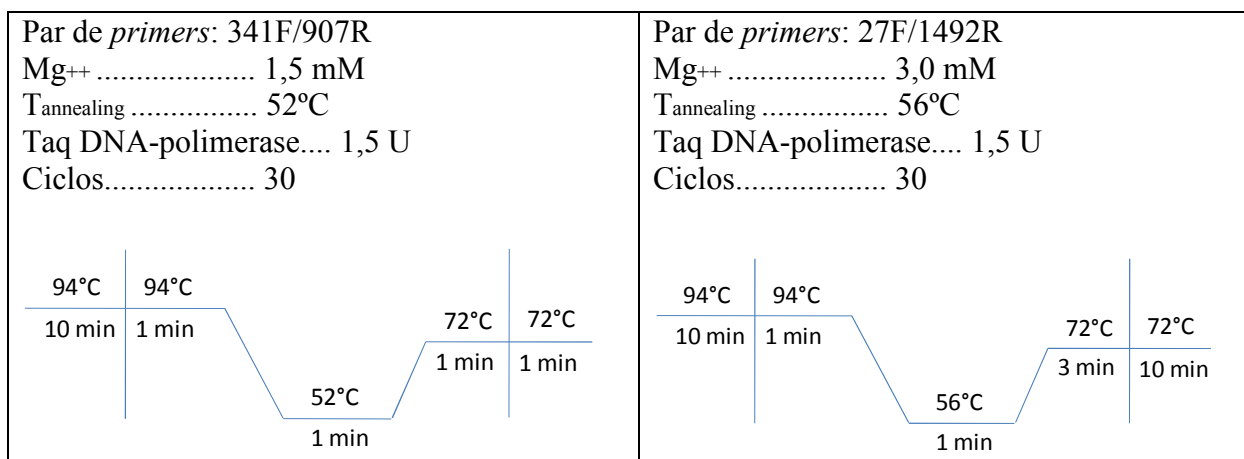


Figura 4.5. *Primers* e programas utilizados nas reações de PCR.

4.4.5 Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE)

A DGGE foi realizada segundo o método descrito por Muyzer *et al.* (1993), com o sistema *DCode Mutation Detection System* (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos). A solução-estoque de acrilamida a 6% (37,5:1- acrilamida:bisacrilamida) foi previamente preparada, para em seguida ser utilizada no preparo das soluções desnaturantes de 0 e 80% de uréia/formamida. A polimerização foi realizada com persulfato de amônio (APS) a 10% e catalisação da reação com tetrametiletenodiamina (TEMED) a 0,1%. Para o estabelecimento do gradiente desnaturante de uréia/formamida específico deste trabalho (30 a 70%), as soluções desnaturantes de 0 e 80%, polimerizador e catalisador foram misturadas - nas proporções descritas no manual do equipamento de DGGE - em um formador de gradientes de duas câmaras com agitação magnética na câmara de saída e distribuição por bomba peristáltica (Figura 4.6A). O gel foi corrido em TAE 1X (80 mM Tris base, 2,0 mM EDTA, 40 mM Acetato de sódio, pH 7,4), a uma temperatura de 60°C, voltagem de 200 V por 4 horas (Figura 4.6B).

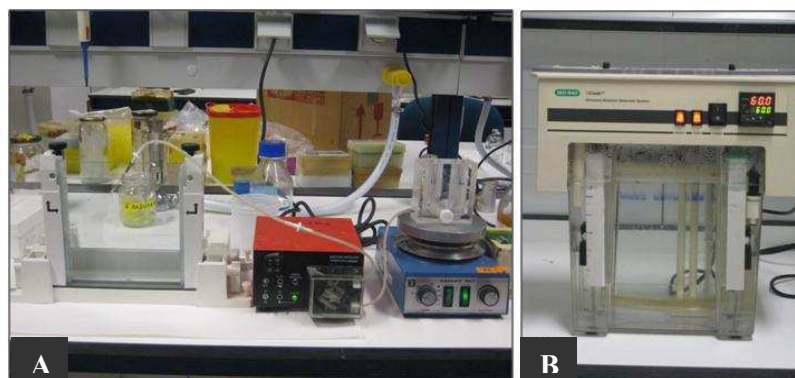


Figura 4.6. A) Equipamento de formação do gradiente de desnaturação do gel de DGGE (preparação do gel); B) Equipamento de DGGE (corrida do gel).

Os géis foram corados em brometo de etídio (1µg/mL) por 20 min., lavados em água comum por 10 min. e logo depois observados em um transiluminador com luz ultravioleta. Várias bandas foram cortadas do gel com um bisturi para posterior análise. O DNA foi eluído em água quente (1 hora a 60 °C), em seguida reamplificado com os mesmos *primers* utilizados para a PCR-DGGE, porém, sem a cauda GC, purificado com o kit *JetQuick PCR Product Purification Spin System* (Löhne, Alemanha), purificados e depois seqüenciados pelo serviço de seqüenciamento do SIDI (*Servicio Interdepartamental de Apoyo a la Investigación, Universidad Autónoma de Madrid*).

Os cromatogramas obtidos foram editados e corrigidos com os programas *PHRED – Electropherogram quality analysis* (<http://helix.biomol.unb.br/phph/>) e *BLAST – Basic local alignment search tool*, que também permitiram a conversão do formato de cromatograma à correspondente seqüência de nucleotídeos. Os arquivos exportados foram analisados com o pacote de *software* online do NCBI usando a base de dados e as ferramentas de análise genética na página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

4.4.6 Biblioteca genômica (clonagem)

A clonagem foi realizada segundo o protocolo do kit *pGEM-T easy vector* (Promega, Madison, Estados Unidos). O sistema se baseia na inserção do fragmento a ser clonado, neste caso o RNAr 16S, em um vetor plasmidial. A enzima T4 DNA ligase foi utilizada para catalisar a ligação entre as extremidades adesivas do plasmídeo aberto (timina) e os resíduos de adenina das extremidades do inserto gerado durante a amplificação pela *Taq* polimerase.

Os produtos das ligações vetor/inserto foram introduzidos em células quimicamente competentes de *Escherichia coli* e plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB)/ampicilina. As

placas de Petri apresentam colônias brancas, que contêm os plasmídeos com os genes clonados de RNAr 16S (devem estar em maior número) e azuis, que contêm os plasmídeos sem os genes do RNAr 16S. As colônias brancas foram repicadas em uma “placa mestre”, com o objetivo de confirmar a presença do inserto. Cada colônia branca isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB, e incubada em agitação a 37°C durante 12 horas. Para obter o DNA plasmidial a partir destes cultivos, foi realizada uma extração alcalina (*miniprep*). Os clones foram conservados em caldo LB adicionado de glicerol (40%), a -70°C.

4.4.7 Análise dos clones

A técnica ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA*) foi utilizada para agrupar os clones idênticos, diferenciá-los dos clones obtidos, e assim, diminuir o número de amostras a serem seqüenciadas. Para tanto, as digestões enzimáticas foram feitas com a enzima endonuclease *Sau3AI*, segundo protocolo descrito abaixo:

DNA	3 µl	} Incubação a 37°C durante 24 horas
<i>Sau3AI</i>	1,2 u (0,3 µl)	
BSA, 1 %	0,15 µl	
Tampão de reação*	1,5 µl	
H ₂ O	10,05 µl	
V _f	15 µl	

* Disponibilizado pela empresa que comercializa a enzima

Os agrupamentos foram realizados mediante comparação de padrões de corrida semelhantes em géis de agarose 1%, e os clones selecionados foram seqüenciados pelo serviço de seqüenciamento do SIDI (*Servicio Interdepartamental de Apoyo a la Investigación, Universidad Autónoma de Madrid*). Para tanto, foram utilizados os *primers* M13F/ M13R/ 341F, criando dessa maneira três subseqüências de cada clone, que coincidem em seus extremos e assim permitem a reconstrução da seqüência do DNAr 16S inteiro.

As unidades taxonômicas operacionais (OTU) resultantes foram comparadas com a base de dados de seqüências de DNAr 16S do NCBI (National Center for Biotechnology Information, EEUU, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e foram classificadas, mediante a criação de grupos de diferente afiliação filogenética. As amostras foram alinhadas com outras seqüências de mesma afiliação taxonômica em nível de filo ou classe. A partir deste alinhamento, foi construída uma árvore filogenética aplicando o método de *Neighbor-Joining* e modelo *Maximum Composite Likelihood* no Programa Mega 4.1. Análise de Bootstrap com 1000 réplicas.

4.5 Análises estatísticas

4.5.1 Abundância de microrganismos específicos

A Análise de Variância Fatorial Múltipla (ANOVA) foi aplicada para simultaneamente examinar os efeitos de variáveis de tratamento categóricas e as interações fatoriais entre elas na média do número relativo de células com sinal positivo para cada sonda específica marcada com Cy3. Foram consideradas variáveis categóricas fixas: tipo de material suporte (quatro níveis), profundidade (três níveis) e COV (dois níveis). As ANOVA foram realizadas separadamente para cada sonda específica utilizando o procedimento GLM (*General Linear Models*) do software JMP 5.0 (SAS Institute Inc., 2002). As respostas das variáveis representadas pelo número relativo de células foram transformadas em $\log_{10}(x + 1)$, assim como para obter a normalidade da distribuição de frequência residual. Essa suposição foi verificada desempenhando o teste Shapiro-Wilk. Múltiplas comparações foram obtidas dos GLM usando o teste paramétrico de Tukey *post hoc* ao nível de 5% de significância.

Os coeficientes de correlação de Pearson (r) foram calculados entre os dados contínuos (concentrações de amônia, nitrito e nitrato e DBO) e o número relativo de células marcadas pelas sondas em cada tipo de material suporte (ZAR, 1984). A correlação entre duas variáveis reflete o grau no qual as variáveis estão relacionadas. A correlação de Pearson reflete o grau de relação linear entre duas variáveis, variando de +1 a -1. A correlação representada por +1 indica uma relação linear positiva entre variáveis. A correlação de Pearson foi determinada utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., 2004).

4.5.2 Similaridade, diversidade e construção de dendogramas

As bandas amplificadas foram marcadas como presentes (1) ou ausentes (0), e matrizes binárias, que representam a ocorrência de bandas no gel de DGGE, construídas. Para a obtenção dos dendogramas, foi utilizada a análise de UPGMA (*Unweighted pair-wise grouping with mathematical averages*). A matriz binária foi traduzida em uma matriz de distância, usando o índice de similaridade de Jaccard (Equação 4.1) (LYAUTEY *et al.*, 2003; JACCARD, 1908).

$$J = [c/(a + b - c)] \times 100 \quad (4.1)$$

Para verificar se houve diferença significativa entre os materiais suporte com relação à ocorrência de bandas de DGGE, análises de contingência foram realizadas por meio do teste Qui-quadrado (χ^2). Além disso, as matrizes de presença-ausência de bandas foram utilizadas para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon -

<http://www.changbioscience.com/genetics/shannon.html> (SHANNON e WEAVER, 1963). O índice de Shannon (H') mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá uma banda escolhida, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N bandas. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa. A diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice. É calculado por meio da Equação 4.2:

$$H' = - \sum_{i=1} p_i \ln (p_i) \quad (4.2)$$

Onde: p_i representa a frequência de cada banda, para i variando de 1 a S (riqueza de espécies).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição das comunidades presentes nos biofilmes

5.1.1 Comunidade associada ao biofilme dos diferentes materiais suporte

A Figura 5.1 (A, B, C, D, E, F, G, H e I) se refere às fotomicrografias obtidas de amostras de biofilmes de diferentes materiais suporte e alturas (topo, meio e fundo) no final da primeira fase de operação dos FBP, conforme observação em microscopia óptica de contraste de fase. Em geral, foram verificados microrganismos filamentosos, cocos, cianobactérias (*Anabaena* sp.) (Figuras 5.1A), algas diatomáceas (Figuras 5.1A e 5.1E) e espiroquetas. Protozoários e nematódeos (*Diplogaster* spp.) (Figura 5.1B), característicos desse reator, também foram constatados, como nos reatores de biofilme aeróbios de fluxo contínuo estudados por Lee e Welander (1994), sendo que *Diplogaster* spp. foi verificado apenas no meio suporte DHS.

Os principais gêneros de microrganismos filamentosos observados, em todos os FBP, foram semelhantes a *Thiothrix* (Figura 5.1H) e *Beggiatoa* (Figura 5.1C e 5.1F). A presença de grânulos intracelulares nessas bactérias foi observada, e possivelmente estão associados ao acúmulo de enxofre, uma vez que estas bactérias oxidam sulfeto a enxofre elementar sob condições aeróbias. *Beggiatoa alba* é uma espécie de bactéria oxidadora de enxofre que contém um sistema múltiplo de transporte de elétrons, tipicamente encontrada em FBP (JAMES, 1964). Vale ressaltar, que estas bactérias foram verificadas predominantemente no topo, possivelmente devido à maior disponibilidade de sulfeto (resultados não apresentados) nesta fração dos FBP.

Aglomerados típicos de bacilos também foram verificados em todos os FBP, possivelmente sendo do gênero *Zooglea* (Figura 5.1I). Este gênero é reconhecidamente importante em sistemas de tratamento biológico de efluentes por promover a agregação (em forma de flocos e biofilmes) de diferentes células microbianas, devido sua capacidade de produção de polímeros extracelulares. James (1964), estudando a microbiota de um filtro biológico percolador, alerta para a identificação destas bactérias pela morfologia, pois outras bactérias capsuladas tipicamente presentes em biofilmes podem apresentar a forma típica “zoogleal” e não serem da espécie *Zooglea ramigera*, predominante em FBP.

As amostras de biofilme dos diferentes materiais suporte aparentemente variaram em termos de número de morfologias observadas. O sistema DHS foi o que apresentou o maior número de morfologias microbianas, possivelmente devido à presença de espaços intersticiais neste material que, por propiciar um maior tempo de retenção de sólidos, favorece o

desenvolvimento de microrganismos (ARAKI *et al.*, 1999). Por outro lado, o conduíte apresentou o menor número de organismos, possivelmente devido à menor capacidade de retenção de biomassa neste material.

5.1.2 Comunidade associada ao biofilme nas diferentes profundidades dos FBP

Quanto às profundidades, no topo foi observado elevado número de organismos pertencentes a diversos grupos (microalgas, cianobactérias, protozoários, nematódeos – *Diplogaster* spp., bactérias e fungos) em todos FBP, possivelmente devido à maior concentração de matéria orgânica e outros constituintes presentes no efluente pré-tratado pelo reator UASB. Lee e Welander (1994) verificaram ciliados, protozoários, flagelados e nematódeos do gênero *Diplogaster* spp. (alimentam-se preferencialmente de bactérias) em reatores aeróbios com biofilmes, como neste estudo (Figura 5.1B).

Mack *et al.* (1975), verificaram em filtros biológicos percoladores que os protozoários predominam na camada superficial do biofilme, onde se alimentam de bactérias e matéria orgânica. Observou também que as algas se desenvolvem sobre a matriz de bactérias e crescem com tamanha abundância que as bactérias heterotróficas desenvolvem colônias “aéreas” para competirem por nutrientes e oxigênio.

Devido ao fato de que as escotilhas dispostas ao longo da altura dos FBP permaneceram abertas por vários dias durante as campanhas de amostragem e coleta de biofilme, o compartimento nitrificante recebia um pouco de luz. Esse fato explica a presença de algas verdes (por ex. gênero *Chlorella*) e diatomáceas em amostras do meio e fundo do reator (Figura 5.1D). O meio do reator, em geral, apresentou menor número de tipos morfológicos, possivelmente devido ao decréscimo da concentração de DBO. Em geral, agrupamentos de cocos (Figura 5.1G) foram detectados no meio e no fundo do reator, embora observados em maior quantidade no topo dos FBP.

A observação das morfologias das comunidades associadas aos biofilmes dos filtros estudados foi de crucial importância para a discussão de questões apresentadas nos itens a seguir, como por exemplo, a verificação do nematódeo *Diplogaster* spp., potencial predador de bactérias (Figura 5.1B).

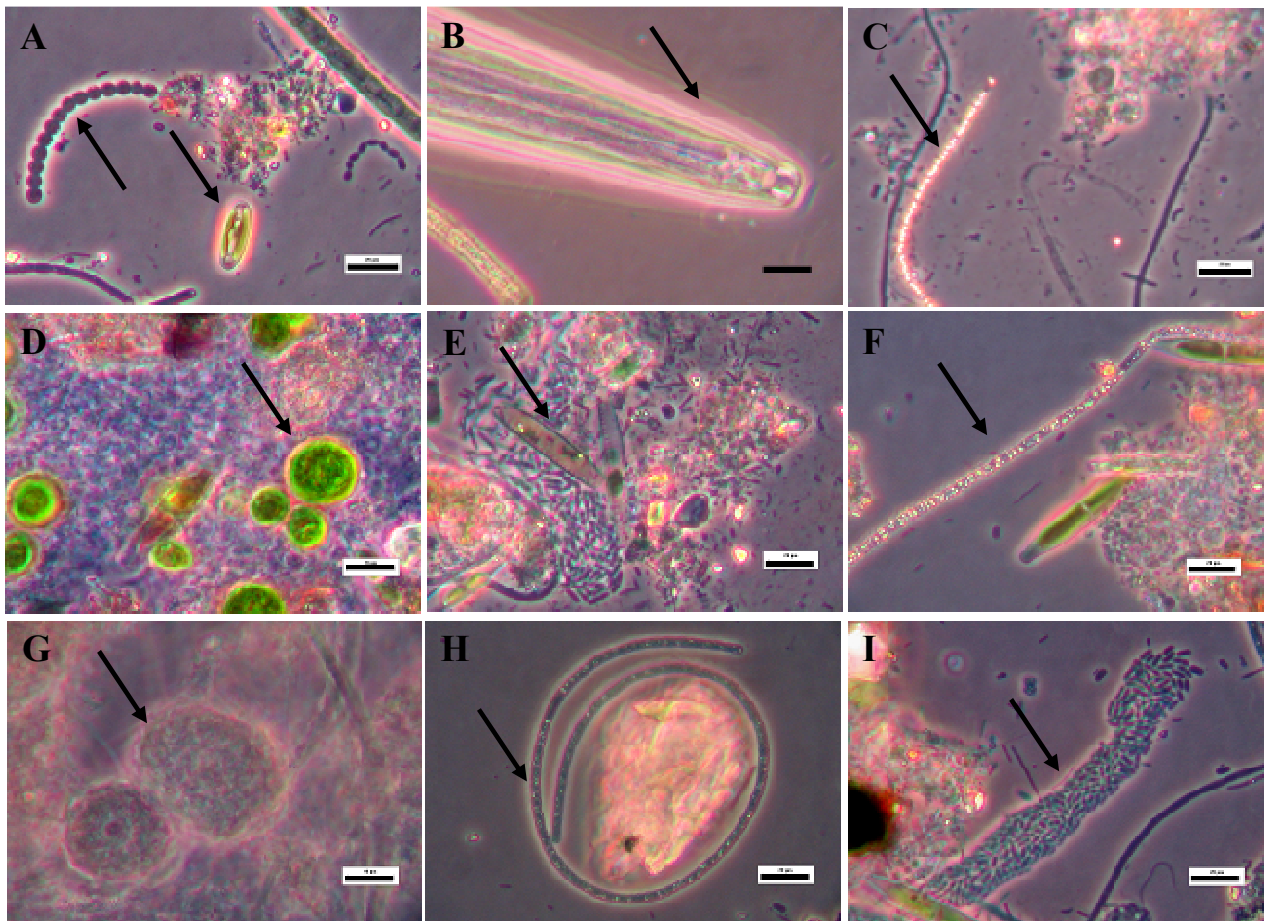


Figura 5.1. Microscopia de contraste de fase do biofilme removido de materiais suporte: (A) Cianobactéria (*Anabaena* sp.) e diatomácea (*Navicula* sp.) – escória; (B) *Diplogaster* spp. (nematódeo) - DHS; (C) *Beggiatoa* – anéis plásticos; (D) Aglomerado de cocos e algas verdes (ordem *Chlorella*) - anéis plásticos; (E) Diatomáceas e aglomerado de bacilos – escória; (F) *Beggiatoa* – DHS; (G) Aglomerados de cocos – anéis plásticos; (H) e (I) *Thiotrix* e *Zooglea*, respectivamente – escória. As barras representam 20 μ m.

5.2 Abundância das comunidades microbianas nos biofilmes

Bactérias oxidadoras de amônia pertencentes ao grupo das β -*Proteobacteria* (detectadas pelas sondas Nso190 e Nso 1225), dois grupos de bactérias oxidadoras de nitrito (visualizados pelas sondas NIT3 e Ntspa662) e a bactéria desnitrificante autotrófica *Thiobacillus denitrificans* (TBD121) foram quantificadas. Os resultados das abundâncias relativas à DAPI de cada sonda quantificada nas amostras das três profundidades dos FBP, considerando as fases experimentais 1 e 2, são mostrados na Figura 5.3.

Todas as sondas, exceto Amx820, resultaram em sinal positivo para todas as amostras analisadas (Figura 5.2). Os resultados negativos para Amx820 sugerem que as condições ambientais dentro dos reatores não foram ideais para o desenvolvimento de bactérias ANAMMOX, embora outros estudos (LYDMARK *et al.*, 2006) tenham reportado a ocorrência de ANAMMOX nas partes mais profundas de filtros percoladores nitrificantes. Isto ocorreu possivelmente devido à presença de microambientes anaeróbios dentro das matrizes biológicas desenvolvidas no biofilme como resultado da colmatação de algumas partes do reator.

Como esperado, a abundância relativa de AOB marcadas pela sonda Nso1225 foi mais alta que a observada para Nso190, pois a Nso1225 engloba quase todas as β -*Proteobacteria*, ao contrário da Nso190 (MOBARRY *et al.*, 1996). Por este motivo, consideramos neste trabalho apenas a contagem de Nso1225 quando nos referimos às AOB. Fundamentado na especificidade das sondas, ao menos quatro diferentes populações de oxidadoras de amônia puderam ser detectadas por Nso1225 e Nso190: (I) *Nitrosomonas oligotropha*, (II) *N. communis*, (III) *N. europaea*, (IV) *N. eutropha*. Estes microrganismos, que apareceram exclusivamente em microcolônias de vários tamanhos, são conhecidos por serem clássicas bactérias oxidadoras de amônia, e as mais comuns AOB encontradas em biorreatores nitrificantes (LYDMARK *et al.*, 2006; JURETSCHKO *et al.*, 1998). *Nitrospira* sp. e *Nitrobacter* sp., bactérias oxidadoras de nitrito marcadas pelas sondas Ntspa662 e NIT3, respectivamente, também foram verificadas nos FBP.

A detecção da bactéria desnitrificante autotrófica *Thiobacillus denitrificans* foi limitada aos materiais suporte DHS (32%, no meio do FBP) e aparas de conduíte (24%, no fundo do FBP), mas apenas ocorreu na fase 2, quando os FBP operaram com uma COV de 0,38 kgDBO/m³.dia. A abundância relativa desses microrganismos no sistema DHS foi maior que a observada para as nitrificantes (AOB+NOB) (Figura 5.3). O desenvolvimento de *T.*

denitrificans apenas nestes materiais suporte pode ter sido favorecido pela existência de micronichos anóxicos formados dentro das esponjas (DHS) e às matrizes biológicas observadas visualmente nos condutos. Estas matrizes não podem ser consideradas como biofilmes, uma vez que não estavam aderidas aos materiais suporte.

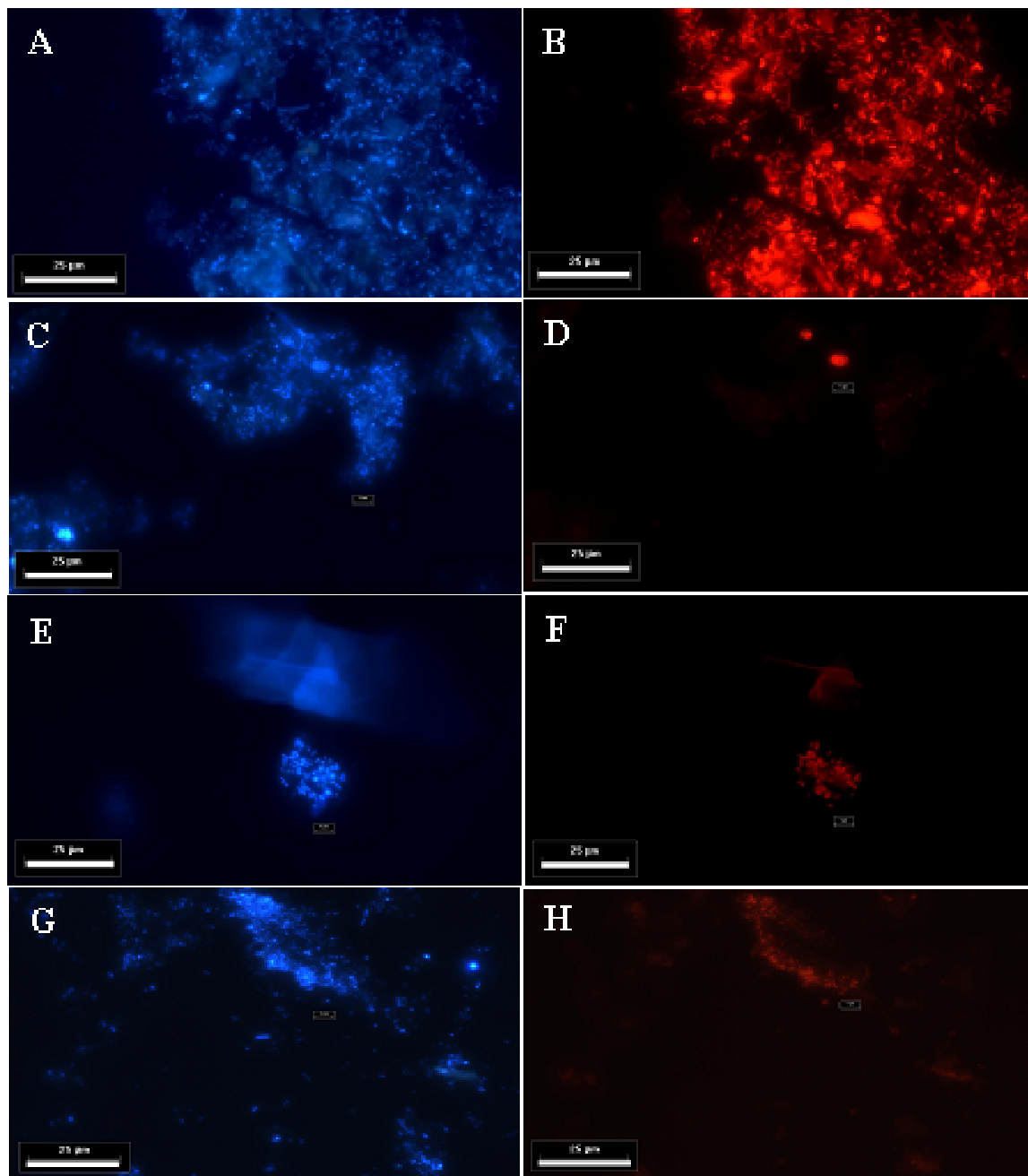


Figura 5.2. Identificação *in situ* de domínio *Bacteria* (A e B), AOB (C e D), NOB (E e F) e *Thiobacillus denitrificans* (G e H) por hibridação específica com sondas marcadas com Cy3 (EUB338, Nso1225, NIT3 e TBD121, respectivamente). Campos microscópicos idênticos foram visualizados para o DAPI (A, C, E e G) e para as respectivas sondas específicas (B, D, F e H). As barras representam 25 μm .

5.2.1 Relação entre abundância de microrganismos e as diferentes profundidades dos FBP

Os testes ANOVA (valores de P em anexo) revelaram que as abundâncias relativas de *Bacteria*, AOB, NOB e *T. denitrificans* variaram significativamente ao longo das diferentes profundidades (GLM; Fator = profundidade; $P < 0,0001$) e nas duas fases (GLM; Fator = COV; $P < 0,0001$) para todos os materiais suporte testados. As diferentes profundidades propiciaram diferentes condições ambientais, isto é, concentrações decrescentes de amônia e substratos orgânicos, e crescentes concentrações de nitrato, que fizeram possíveis os diversos estabelecimentos e abundâncias de *Bacteria*, AOB, NOB e *T. denitrificans* na porção do meio dos reatores.

De acordo com os perfis microbiológicos (Figura 5.3) há um aumento na abundância relativa de membros do domínio *Bacteria* marcados por EUB338, do topo para o meio de todos os FBP. Particularmente no sistema DHS, as nitrificantes (AOB+NOB) mostraram uma típica distribuição vertical, isto é, um significativo aumento de células do topo para fundo do filtro, que é coerente com o decréscimo das concentrações de DBO e amônia ao longo dos filtros. Estes resultados estão de acordo com a maior diversidade de morfotipos encontrada no topo do FBP preenchido por DHS, por microscopia de contraste de fase. A presença de rotíferos e nematódeos pode ter sido responsável pela menor abundância de bactérias nesta profundidade dos reatores, devido à competição e predação destas.

A baixa concentração de nitrificantes no topo do sistema DHS aconteceu provavelmente devido à alta COV nesta altura. É possível que a competição por oxigênio e espaço tenha sido muito intensa no topo, como resultado da retenção de matéria orgânica dentro das esponjas, e sua posterior oxidação por bactérias não-nitrificantes (heterotróficas) na porção mais elevada do FBP. Em contrapartida, as porções mais baixas do sistema DHS podem proporcionar um ambiente favorável para o crescimento e estabelecimento de microrganismos de crescimento lento (como as nitrificantes), devido à retenção intersticial de microrganismos nas esponjas.

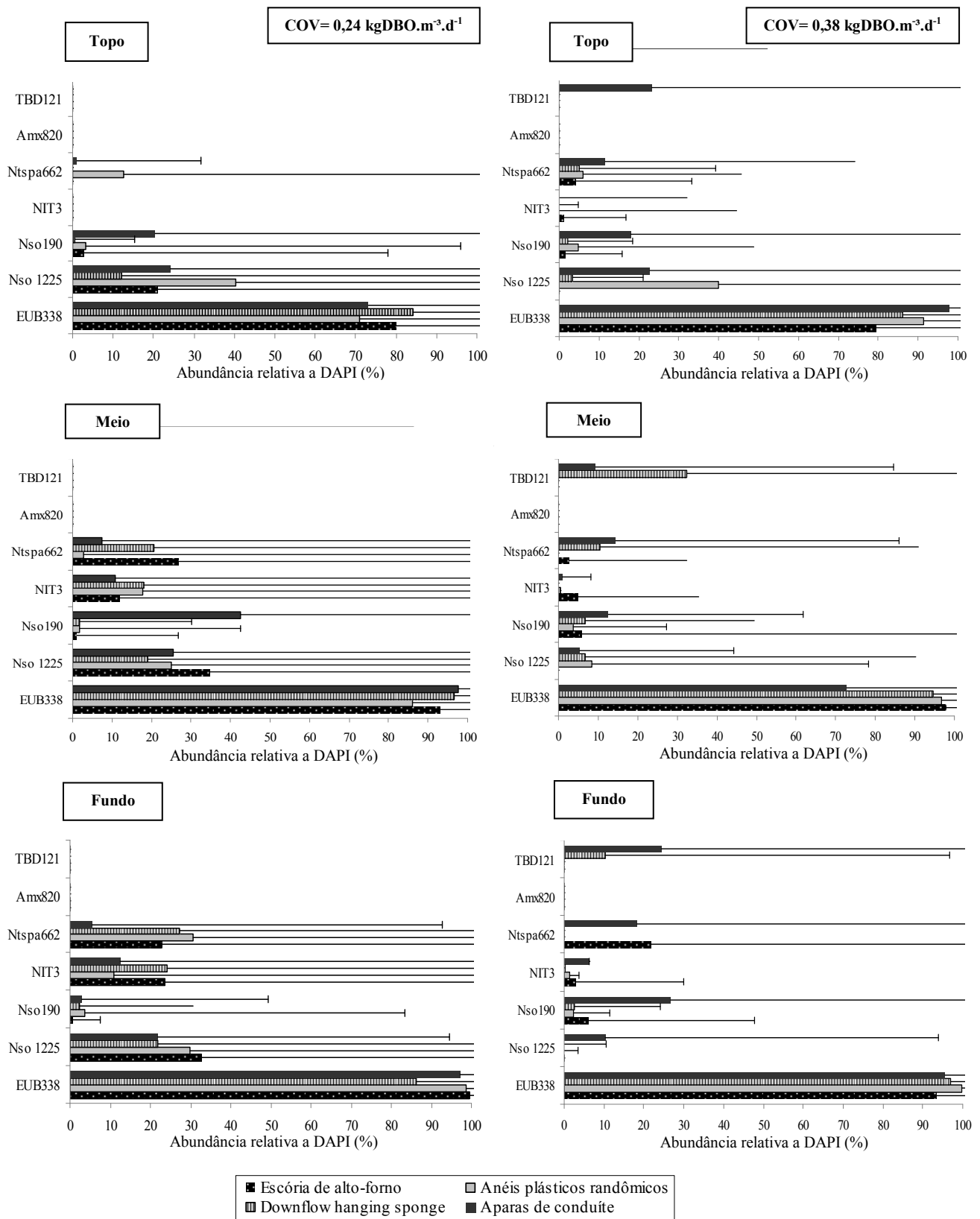


Figura 5.3. Distribuição de *Bacteria*, AOB, NOB e *T. denitrificans* nos FBP. Os alvos das sondas são dados na Tabela 4.2. Cada gráfico mostra como a quantidade relativa de cada sonda comparada ao corante DAPI (eixo x) foi distribuída entre as diferentes profundidades e materiais suporte nos FBP. N = 10; Barras de erro = desvio padrão.

Embora haja uma tendência a observar um aumento das contagens de *Nitrospira* (Ntspa662) no fundo dos FBP preenchidos com DHS e anéis plásticos (Tabela 5.1), estatisticamente não há diferença significativa das abundâncias relativas ao longo dos reatores (GLM; Fator = profundidade; F = 13,54; P<0,0001).

Tabela 5.1. Média aritmética do número de células por micrograma (peso úmido) de biofilme removido dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,24 kgDBO/m³.d.

Materiais suporte	Profundidades (m)	DAPI	Bacteria (EUB338)	AOB (Nso1225)	AOB (Nso190)	NOB (NIT3)	NOB (Ntspa662)	ANAMMOX (Amx820)	Thiobacillus (TBD121)
Escória de alto forno	0	298,35±19,4	238,1±44,3	62,4±27,5	8,3±14,6	0±0	0±0	0±0	0±0
	1,25	235±23,8	218,4±60,9	81,7±48,7	2,6±6,1	28±73,7	62,8±35,3	0±0	0±0
	2,15	224,6±26,3	223,3±44,4	73,7±55,3	0,9±1,9	53±111,4	51,5±40,8	0±0	0±0
Anéis plásticos randômicos	0	570,2±47,2	404±109,2	230,5±113,5	18,3±43,8	0±0	72,5±131,9	0±0	0±0
	1,25	258±22,1	222,1±62,7	64,3±48,2	4,6±9	46±98,6	7,4±23,4	0±0	0±0
	2,15	249,6±21,4	246,1±46,3	74,7±28,8	9,2±17,1	27±48	76,6±26,9	0±0	0±0
Downflow hanging sponge	0	533,9±49,6	448,9±98,5	64,4±139,3	2,5±7,4	0±0	0±0	0±0	0±0
	1,25	483,6±39,2	736,1±103,5	92,8±74,9	8,7±11,2	87±96,7	99,5±55,6	0±0	0±0
	2,15	611,5±71,8	527,3±82	133,4±76,8	13,8±20,4	148,3±196,8	166,5±150,9	0±0	0±0
Aparas de conduíte	0	37,4±4	27,3±9,6	9±4,4	7,6±5,4	0±0	0,4±1,2	0±0	0±0
	1,25	35,2±2,4	34,4±8,1	9±7,3	15±7,4	3,8±4,1	2,6±3,7	0±0	0±0
	2,15	299,1±30,9	290,9±96,4	65±22,5	8,4±14,4	37±55	16,2±27	0±0	0±0

N=10 campos visuais; contagem direta de células. ±desvio padrão.

Considerando as contagens de NOB na fase 2 (Tabela 5.2), as abundâncias mais baixas foram observadas no meio e fundo do FBP preenchido com anéis plásticos e no fundo do DHS. Esta evidência pode ser explicada pelo acúmulo de nitrito nestas porções, como apresentado na Figura 5.4. Adicionalmente, é possível que o acúmulo de nitrito tenha sido coerente à redução das concentrações de oxigênio no fundo do sistema DHS.

Tabela 5.2. Média aritmética do número de células por micrograma (peso úmido) de biofilme removido dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,38 kgDBO/m³.d.

Materiais suporte	Profundidades (m)	DAPI	Bacteria (EUB338)	AOB (Nso1225)	AOB (Nso190)	NOB (NIT3)	NOB (Ntspa662)	ANAMMOX (Amx820)	Thiobacillus (TBD121)
Escória de alto forno	0	119,4±18,6	94,8±40,7	0±0	1,6±2,6	1,3±1,5	4,9±5,4	0±0	0±0
	1,25	38,8±5	38±10,5	0±0	2,3±6,5	1,9±2,2	1±1,5	0±0	0±0
	2,15	105,1±8	98,1±24,7	0±0	3,65±3,32	3±2,9	122,9±138,4	0±0	0±0
Anéis plásticos randômicos	0	106,1±11,3	96,9±57,8	42,3±39,9	5,2±5	0±0	6,3±4,5	0±0	0±0
	1,25	197,5±34,4	191,2±180,8	16,6±24,1	7,4±8,1	1±1,4	0±0	0±0	0±0
	2,15	308,8±57,7	307,8±268,6	0,65±1,8	7,2±5,2	4,6±5	0±0	0±0	0±0
Downflow hanging sponge	0	1448,7±199,5	1247±1048,8	48±35,4	29,6±32,7	0±0	72,1±68,3	0±0	0±0
	1,25	1417±152,9	1342±555,6	94,5±127,9	95±65,2	0±0	149,6±122,8	0±0	459,2±953,4
	2,15	3358,2±326	3252,6±609,9	11,7±33,1	87±70	9,8±9,6	0±0	0±0	346,1±281,3
Aparas de conduíte	0	260,3±44,1	254,8±188,4	59±67,8	47±43,7	0±0	29,9±27,6	0±0	60,6±83
	1,25	104,1±24,3	75,6±66,4	5,6±9,5	13±12	1±1,7	15,1±17,4	0±0	9,8±18,3
	2,15	193,1±39	184,7±131,9	19,9±32,6	51,4±69,2	12±14,1	35,4±55,9	0±0	46,9±71,4

N=10 campos visuais; contagem direta de células. ±desvio padrão.

Enquanto as comunidades de AOB pareceram ser estáveis ao longo dos FBP, isto não ocorreu com as NOB. Como esperado, fundamentado na carência de produção de nitrato no topo dos filtros, não houve abundância significativa de *Nitrobacter* (NIT3) nestas amostras. O aumento

significativo (GLM; Fator = profundidade; $P < 0.0001$) da quantidade de células desta bactéria foi detectado no fundo dos FBP, em ambas as fases, em consonância com as elevadas concentrações de nitrato também verificadas nesta porção dos filtros (Figura 5.4). A existência de correlação entre a abundância de células de *Nitrobacter* (NIT3) e as concentrações de nitrato responde uma das questões-chave deste trabalho.

Os membros do gênero *Nitrospira* podem, assim, ser considerados K-estrategistas, adaptados a baixas concentrações de nitrito e oxigênio, estando distribuídos de forma constante ao longo dos filtros. Em contrapartida, *Nitrobacter* podem ser considerados r-estrategistas, com crescimento relativamente acelerado somente em altas concentrações de nitrito, possuindo baixas afinidades por nitrito e oxigênio. O predomínio de *Nitrospira* sobre *Nitrobacter* na maioria das ETE é, desta forma, um reflexo de suas diferentes estratégias de sobrevivência, enquanto *Nitrobacter* perdem a competição devido às baixas concentrações de nitrito encontradas em grande parte dos sistemas de tratamento de esgotos domésticos (DAIMS *et al.*, 2001).

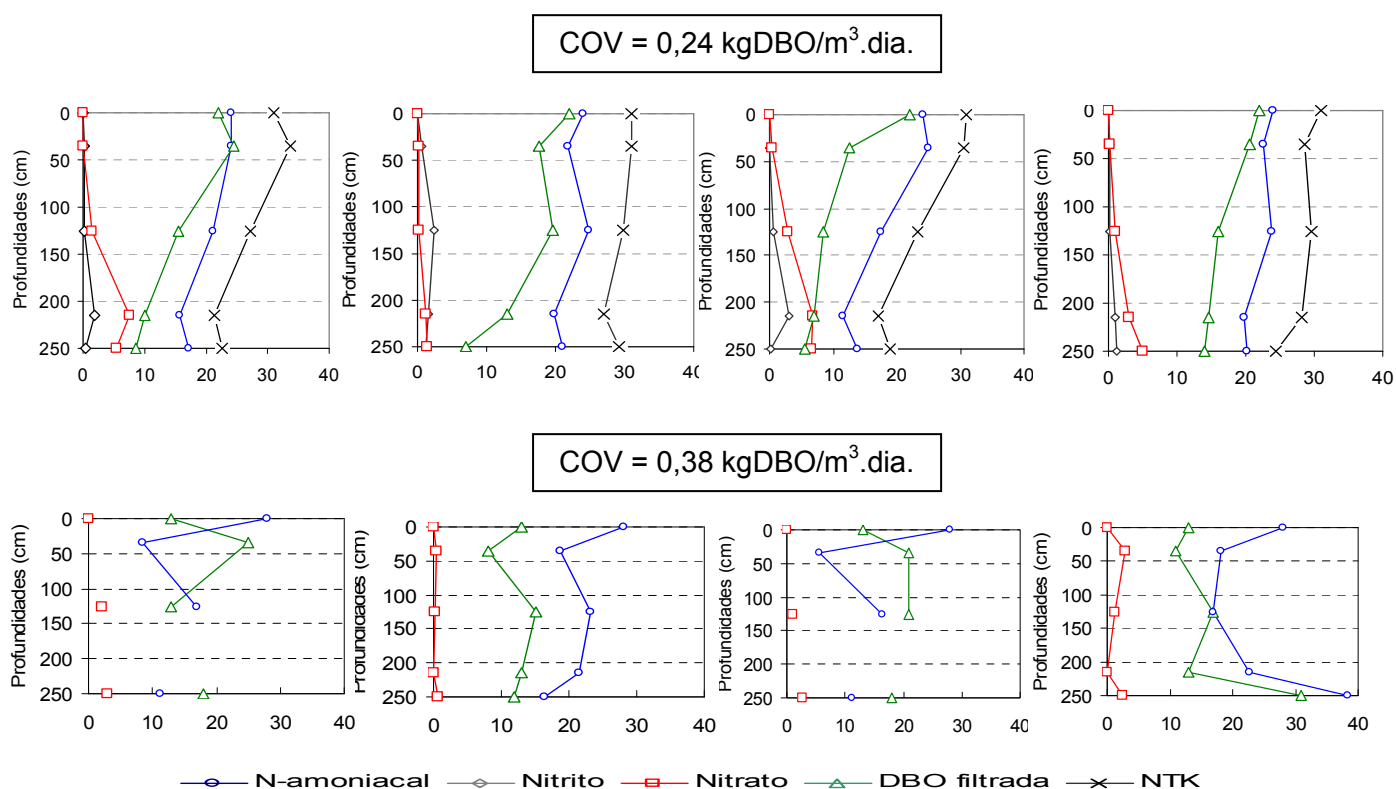


Figura 5.4. Médias das concentrações (em mg/L) de N-amoniaco, N-nitrato, N-nitrito, DBO filtrada e NTK nas três profundidades e nos quatro diferentes materiais suporte nas duas COV impostas (adaptada de ALMEIDA *et al.*, 2007).

5.2.2 Relação entre a abundância de microrganismos e os diferentes materiais suporte

Os resultados dos testes ANOVA mostraram que diferentes materiais suporte abrigam uma ampla faixa de abundância microbiana ($P < 0,0001$). Isto ocorre possivelmente devido às diferentes constituições químicas e configurações dos materiais suporte, que proporcionam condições ambientais distintas (como por exemplo, os espaços intersticiais do sistema DHS, as partes subutilizadas das aparas de conduíte, devido ao umedecimento ineficiente de toda a superfície do material), conduzindo ao desenvolvimento de perfis diferentes de distribuição e abundâncias de *Bacteria*, AOB e NOB.

Os resultados das análises físico-químicas dos compostos nitrogenados da fase 1 tiveram uma forte relação com os dados microbiológicos anteriormente citados, uma vez que as eficiências de remoção de amônia e as concentrações de nitrato no efluente tratado foram estatisticamente diferentes entre todos os materiais suporte testados, considerando a COV aplicada de 0,24 kgDBO/m³.dia (ALMEIDA *et al.*, 2007).

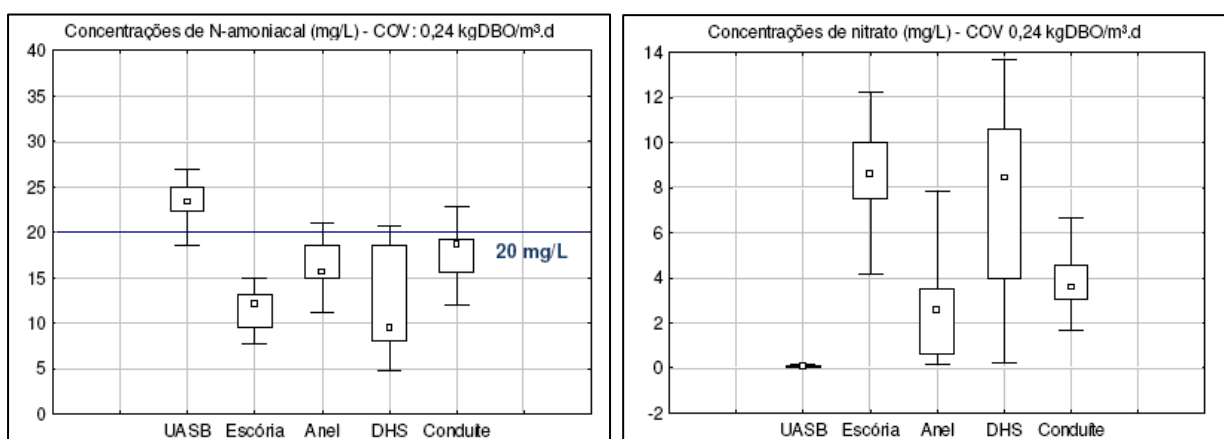


Figura 5.5. Médias das concentrações de N-amoniacal (mg/l) e N-nitrato (mg/l) para todos os materiais suporte na COV=0,24 kgDBO/m³.dia (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Os gráficos *boxplots* apresentados na Figura 5.5 mostram uma grande amplitude inter-quartis para o sistema DHS na remoção de amônia e também para as concentrações de nitrato efluente. Isto sugere que este material foi o que apresentou maior sensibilidade às variações que ocorreram no sistema, resultando na instabilidade dos processos de remoção de amônia e produção de nitrato. Contudo, o DHS foi o material suporte que apresentou estatisticamente (Kruskall-Wallis $\alpha = 5\%$) a maior produção de nitrato, juntamente à escória de alto-forno.

Além disso, o sistema DHS apresentou a maior abundância de microrganismos, devido aos maiores valores médios de contagens de células marcadas com DAPI em ambas as fases, comparado aos outros tipos de materiais suporte (GLM; Fator = material suporte x COV; F =

407,96; $P < 0,0001$). A sonda EUB338 cobriu de 71 a 100% do total das células marcadas por DAPI. A porção remanescente DAPI-EUB pode ser constituída de bactérias não detectáveis pela sonda utilizada e, ainda, por células mortas que são coradas pelo DAPI, por possuírem a parede celular íntegra. Estes resultados estão de acordo com Daims *et al.* (2001), que estudaram reatores com biofilmes em bateladas sequenciais (SBBR), e concluíram que apesar de sondas confiáveis e amplamente testadas serem utilizadas para a detecção de EUB, não se pode excluir a possibilidade de ocorrência de *Bacteria* ainda não identificadas, ou com seqüências não abrangidas pelas sondas utilizadas (esta discussão pode ser aplicada a todas as sondas empregadas). Entretanto, apesar destas incertezas, acredita-se que estes resultados não introduzem erros sistemáticos, e as proporções medidas de *Bacteria*, AOB, NOB e *T. denitrificans* descrevem adequadamente a composição microbiana do biofilme dos FBP.

A abundância relativa de nitrificantes (AOB+NOB) no sistema DHS foi 36 a 88 vezes maior do que nos outros materiais suporte testados. Isto ocorreu, possivelmente, devido à existência de espaços intersticiais nas esponjas, que permitiram longos tempos de contato entre a biomassa e o substrato. Esta alta abundância de nitrificantes, associada ao alto potencial de retenção de sólidos (e, conseqüentemente, microrganismos) das esponjas, é, provavelmente, a razão dos bons resultados relacionados à remoção de amônia no filtro preenchido com DHS (Figuras 5.4 e 5.5).

Os outros materiais suporte (escória de alto-forno, anéis plásticos e aparas de conduíte) apresentaram estatisticamente a mesma abundância relativa de nitrificantes ($P < 0,0001$), porém, diferentes distribuições. Apesar dos anéis plásticos terem apresentado altas contagens de *Bacteria* e nitrificantes em ambas fases de operação, não foi observada uma remoção de amônia considerável, mesmo apresentando elevada área superficial. A dificuldade de aderência do biofilme às aparas de conduíte, resultado do rápido descolamento dos biofilmes mais antigos, pode ser a razão principal para as altas contagens de nitrificantes, concomitantes à baixa remoção de amônia neste filtro. Elenter *et al.* (2007) encontraram resultados similares investigando o efeito do descolamento do biofilme na competição de bactérias heterotróficas e nitrificantes em um reator tubular de biofilmes com pedaços de vidros cilíndricos como material suporte. A baixa eficiência de umedecimento (visualmente observada) relatada aos anéis plásticos e aparas de conduíte também podem explicar a baixa remoção de amônia nestes sistemas.

Da comparação entre a abundância relativa de bactérias nitrificantes e a variação das concentrações de amônia e nitrato (Figura 5.6), parece que a remoção de amônia aumentou

quando a abundância relativa de NOB estava acima de 30%, para todos os FBP, mas apenas na fase 1 (COV = 0,24 kgDBO/m³.dia). Na fase 2 (COV = 0,38 kgDBO/m³.dia) as NOB não alcançaram esta proporção e, conseqüentemente, não foi observada nitrificação para esta COV.

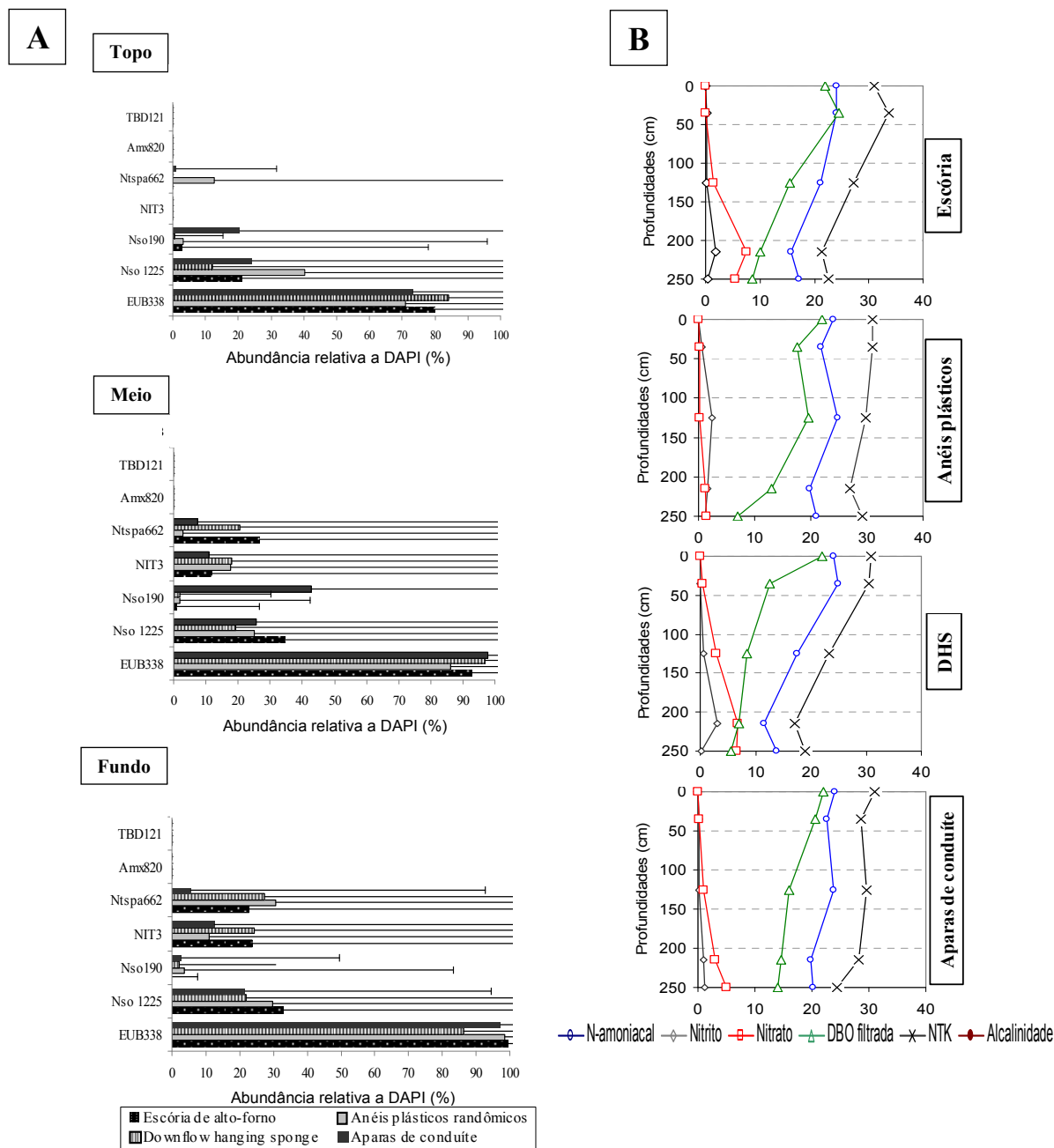


Figura 5.6. A) Distribuição de NOB (representadas pelas sondas Ntspa662 e NIT3) nos FBP. Cada gráfico mostra como a quantidade relativa de cada sonda comparada ao corante DAPI (eixo x) foi distribuída entre as diferentes profundidades e materiais suporte nos FBP. Barras de erro = desvio padrão; B) Médias das concentrações de N-amoniaco (mg/l) e nitrito (mg/l) para todos os materiais suporte nas condições operacionais da fase 1 (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Os testes de correlação de Pearson mostraram uma forte correlação (significativa ao nível 0,05; N = 30) entre as contagens de NOB e as concentrações de nitrito, nitrato e DBO no

sistema DHS, elucidando um importante tópico citado nos objetivos específicos. Uma correlação positiva entre as contagens de NOB e as concentrações de nitrito (correlação de Pearson NIT3 = 0,39; Ntspa662 = 0,55) e nitrato (correlação de Pearson NIT3 = 0,37; Ntspa662 = 0,51) foi observada, significando que quanto mais altas as contagens de NOB, mais altas são as concentrações de nitrito e nitrato. Como esperado, o filtro preenchido por DHS apresentou uma correlação negativa entre as NOB e a DBO, isto é, concentrações mais baixas de DBO resultam no aumento da quantidade de NOB (correlação de Pearson NIT3 = 0,35; Ntspa662 = 0,48) (Figura 5.6).

5.2.3 Relação entre a abundância de microrganismos e as distintas COV

A premissa de que COV mais elevadas proporcionam níveis mais altos de bactérias heterotróficas comparadas às nitrificantes foi checada e confirmada pelo ANOVA. Os números de *Bacteria* foram significativamente maiores na fase 2 (COV = 0,38 kgDBO/m³.dia), comparados aos da fase 1 (COV = 0,24 kgDBO/m³.dia) (GLM; Fator = COV; F = 25,61; P<0,0001). A variação dos perfis de *Bacteria*, AOB e NOB entre os materiais suporte foram significativamente diferentes nas duas fases (GLM; Fator = COV; P<0,0001). Além disso, o teste ANOVA detectou um decréscimo significativo da quantidade de nitrificantes em todos os FBP durante a fase 2, quando comparada à fase 1 (GLM; Fator = material suporte x COV; P<0,0001). Isto ocorreu possivelmente devido à COV mais alta imposta na fase 2, que favoreceu o crescimento excessivo e predomínio de bactérias heterotróficas sobre as nitrificantes. Estes fatos verificados estão de acordo com a baixa remoção de amônia observada na fase 2 (Figura 5.4).

As proporções de nitrificantes pelas células coradas por DAPI decresceram de 13 a 86% na fase 1 para 3 a 57% na fase 2. Apenas as aparas de conduíte apresentaram a mesma abundância relativa em ambas as fases de operação (P<0,0001). Estas análises explicaram uma pergunta proposta dos objetivos do trabalho, com a confirmação de que COV mais elevadas favorecem o crescimento de bactérias heterotróficas, que competem por oxigênio e espaço com as nitrificantes, inibindo seu desenvolvimento. Estas são consideradas as causas mais prováveis para a inibição do processo de nitrificação em todos os filtros na fase 2.

Um resultado interessante foi a detecção de *Thiobacillus denitrificans* nos materiais DHS e aparas de conduíte, mas apenas durante a fase 2 (COV mais elevada) (Tabela 5.2). A formação de microambientes anóxicos nestes materiais suporte é uma possível explicação para esta observação. *T. denitrificans* são bactérias desnitrificantes autotróficas amplamente distribuídas em ETE, onde uma complexa interação de fatores físicos, químicos e

microbiológicos no biofilme favorece a presença de diversos aceptores (por exemplo, oxigênio e nitrato) e doadores de elétrons (compostos sulfurados reduzidos, como sulfeto, por exemplo), com a conseqüente utilização seqüencial dos mesmos (ROBERTSON e KUENEN, 2006).

5.3 Caracterização das comunidades do domínio Bacteria

A técnica PCR-DGGE foi empregada para investigar a evolução da comunidade bacteriana ao longo das três profundidades dos quatro FBPs em uma COV de 0,24 kgDBO/m³.dia.

O DNA genômico foi eficientemente extraído das amostras de biofilme coletadas na COV de 0,24 kgDBO/m³.dia., e sequências do gene DNAr 16S foram amplificadas por PCR com o par de *primers* universal para o domínio *Bacteria* 341F-GC/907R. Os resultados das PCRs realizadas em uma única rodada, diretamente com o *primer* com grampo GC, foram melhores que os resultados de duas rodadas (PCR-*Nested*), uma sem e uma com o grampo, respectivamente. Isto foi evidenciado pela maior concentração de amplicons, visualizada pela intensidade das bandas (dados não apresentados).

A integridade do DNA genômico total extraído e o tamanho correto dos produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1%, usando o marcador de peso molecular fago ϕ 29 digerido com a enzima *Hind III* (Figura 5.7A). O meio do FBP preenchido por conduíte não foi analisado porque a amostra foi esgotada em tentativas de extrair o DNA, que estava degradado.

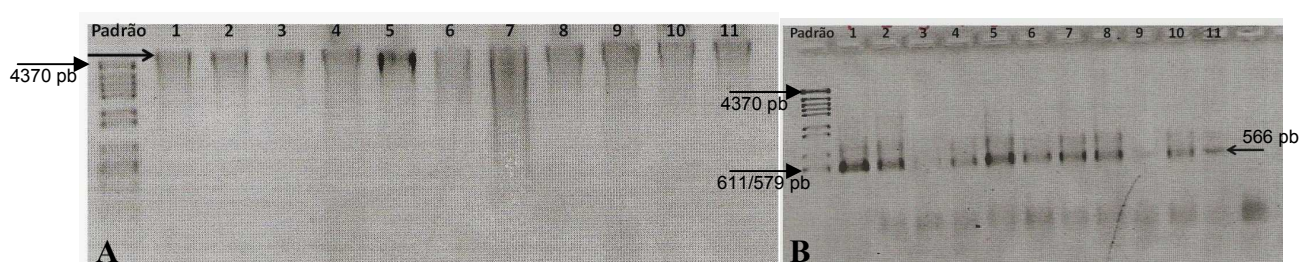


Figura 5.7. Eletroforese de DNA em géis de agarose 1%. A) extratos de DNA genômico de amostras de biofilme dos quatro FBP nas três alturas. Linhas 1-3: escória; 1. topo, 2. meio, 3. fundo. Linhas 4-6: anéis plásticos; 4. topo, 5. meio, 6. fundo. Linhas 7-9: DHS; 7. topo, 8. meio, 9. fundo. Linhas 10-12: 10. topo, 11. fundo. B) produtos de PCR com *primers* 341F-GC e 907R, destinados à DGGE.

Bandas inespecíficas foram observadas no gel da Figura 5.7B. As causas para o aparecimento destas são variadas, uma vez que diversos fatores podem ser responsáveis, como a contaminação do DNA com proteínas, ou baixa concentração de magnésio, por exemplo. Possíveis soluções para eliminar as bandas inespecíficas incluem: aumentar temperatura de anelamento, diminuir a concentração de magnésio, diminuir as quantidades de *primers*, DNA e *Taq* (HENEGARIU, 1997). Todas estas alternativas foram testadas, mas sem sucesso. Contudo, estas bandas inespecíficas aparentemente não influenciaram na qualidade final do gel de DGGE.

O perfil de bandas referente às amostras da COV de 0,24 kgDBO/m³.dia é mostrado na Figura 5.8. A análise visual do gel sugere padrões distintos para a maioria das amostras. Um total de 20 bandas foi escolhido para a comparação entre as amostras, pelas análises das seqüências obtidas.

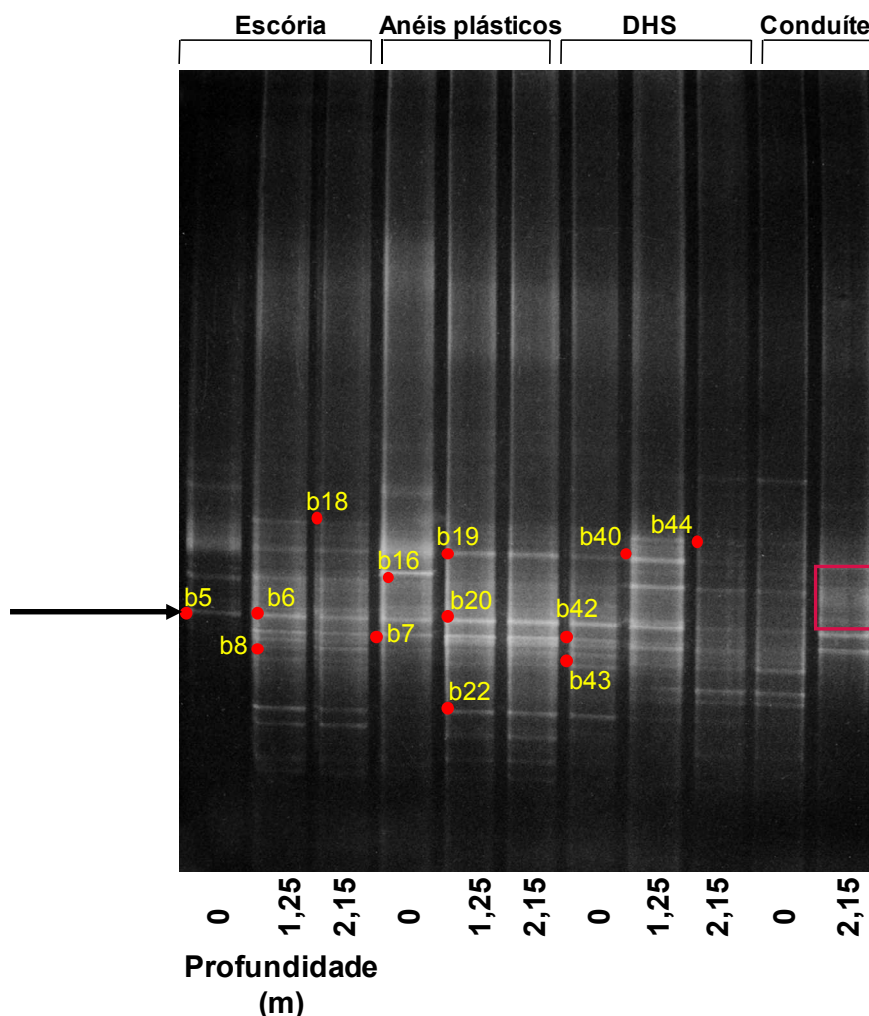


Figura 5.8. Gel de DGGE para o domínio *Bacteria* (amostras de biofilme removidas dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,24 kgDBO/m³.d.). Os números indicam bandas cortadas, reamplificadas e seqüenciadas com sucesso.

As análises do gel de DGGE demonstraram a presença de várias bandas distinguíveis no padrão de separação, provavelmente derivadas de diferentes espécies de bactérias constituindo as populações. Bandas comuns aos diferentes FBP e às distintas profundidades foram claramente visualizadas no gel, sugerindo a dominância de uma bactéria que desempenha uma função essencial ao processo.

O aparecimento de *smears* nas canaletas de todas as amostras (destaque retangular da figura 5.8) ocorreu, possivelmente, devido à alta diversidade de espécies de bactérias presentes em águas residuárias, que resulta na formação deste “rastros” no gel de DGGE pelo alto número de bandas de intensidade fraca. Estas populações, que representam uma baixa porcentagem,

não são detectadas por essa técnica, uma vez que os padrões de bandas de DGGE refletem apenas as espécies mais abundantes na comunidade microbiana (BOON *et al.*, 2002).

Em geral, ecossistemas altamente diversos, como solos, sedimentos e sistemas de tratamento de esgotos, possuem padrões de bandas de DGGE complexos, difíceis de interpretar, devendo ser discutidos cautelosamente. Sendo assim, uma reprodução esquemática dos padrões de bandas do gel de DGGE foi realizada (Figura 5.9), com a finalidade de analisar os resultados com maior clareza.

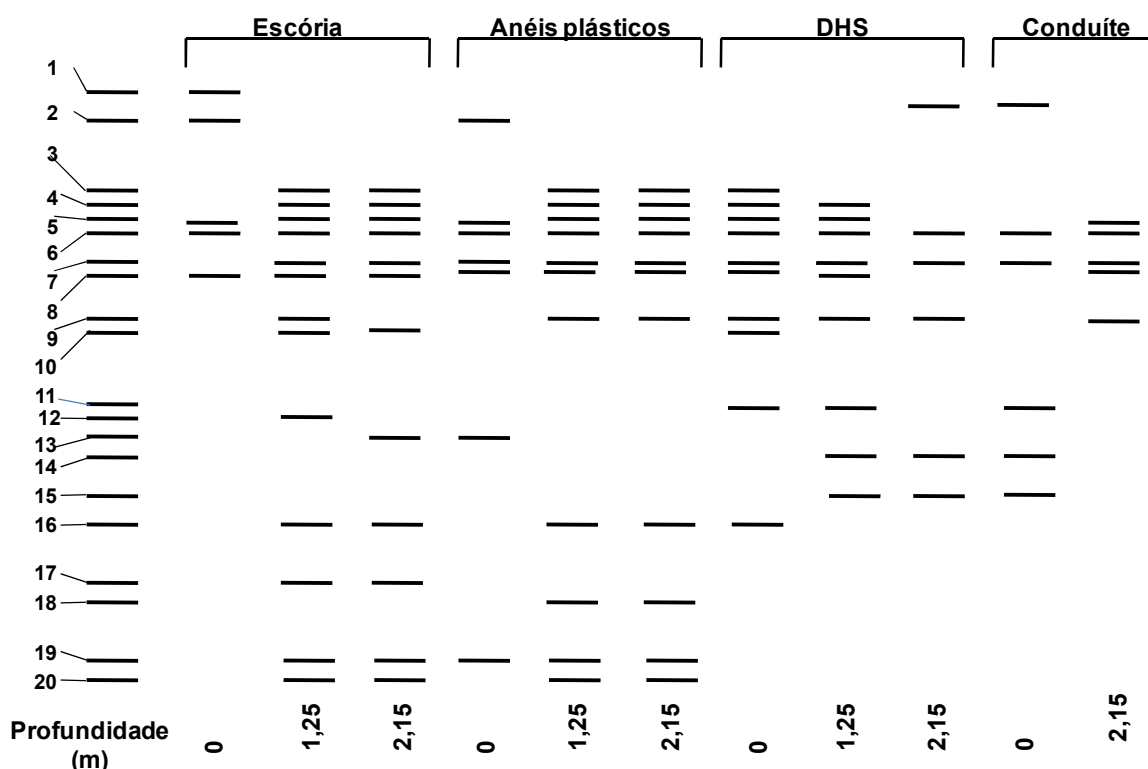


Figura 5.9. Esquema dos perfis das bandas do gel de DGGE para o domínio *Bacteria* (amostras de biofilme removidas dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,24 kgDBO/m³.d.). Os números da esquerda indicam o número de bandas distintas no gel. Todas as bandas foram removidas.

Os diferentes padrões de bandas foram então examinados de três formas: análise de similaridade (coeficiente de Jaccard e *cluster*), por análise de contingência e pelo índice de diversidade de Shannon. Primeiramente, as informações das diferentes canaletas foram transcritas manualmente em uma matriz de presença-ausência (Figura 5.10A), que foi utilizada para a construção da matriz de distância (Figura 5.10B) pelos cálculos dos coeficientes de Jaccard. Com base nos valores da matriz resultante, foi executada a análise de *cluster* (UPGMA), e as 11 amostras foram visualizadas em um dendograma (Figura 5.10C).

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	33,3	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	35,3	88,0	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-
4	66,7	50,0	63,2	100,0	-	-	-	-	-	-	-
5	37,5	83,3	78,3	55,6	100,0	-	-	-	-	-	-
6	37,5	83,3	78,3	55,6	100,0	100,0	-	-	-	-	-
7	40,0	78,3	72,7	47,1	76,2	76,2	100,0	-	-	-	-
8	42,9	54,5	47,6	50,0	60,0	60,0	73,7	100,0	-	-	-
9	54,5	31,6	22,2	30,8	35,3	35,3	37,5	66,7	100,0	-	-
10	54,5	21,1	22,2	30,8	23,5	23,5	37,5	66,7	83,3	100,0	-
11	60,0	55,6	47,1	66,7	62,5	62,5	66,7	71,4	54,5	36,4	100,0

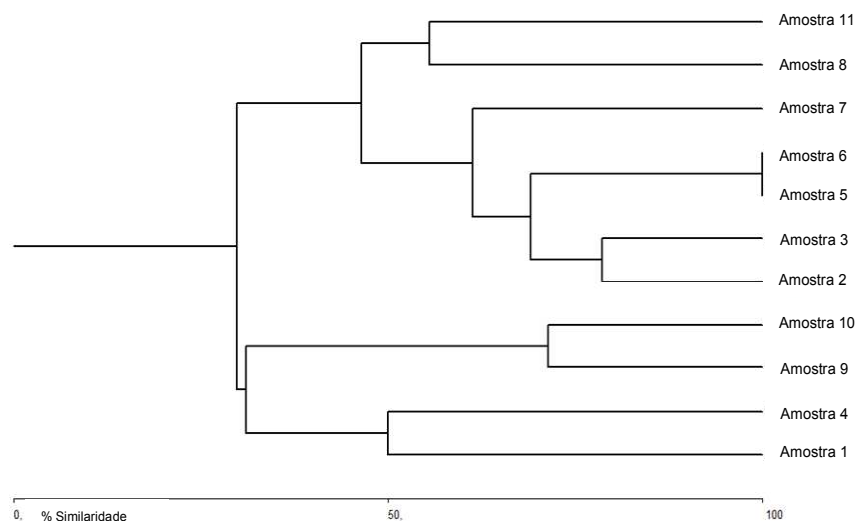
C

Figura 5.10. A) Matriz binária criada a partir dos padrões de bandas do gel de DGGE de *Bacteria* para os quatro FBP. Escória - 1. topo, 2. meio, 3. fundo. Anéis plásticos - 4. topo, 5. meio, 6. fundo. DHS - 7. topo, 8. meio, 9. fundo. Conduíte - 10. topo, 11. meio; B) Matriz de distância (coeficiente de similaridade de Jaccard); C) UPGMA.

A análise de *cluster* (Figura 5.10C) possibilitou a comprovação da alta similaridade entre as profundidades meio e fundo de todos os FBP, levando em conta a escala de distância porcentual. As amostras 5 e 6, que correspondem ao meio e fundo do FBP preenchido por anéis plásticos apresentaram 100% de similaridade, ou seja, as duas profundidades apresentam possivelmente a mesma composição microbiana. Vale ressaltar que este FBP apresentou baixa eficiência de remoção de amônia (18%), quando comparado à escória e ao DHS (32,5% e 52,5% respectivamente), apesar de ter apresentado altas concentrações de AOB e NOB (ver item 5.2).

A similaridade foi observada também entre profundidades diferentes de materiais suporte distintos, como por exemplo, as amostra 9 e 10, correspondentes ao fundo do FBP preenchido por DHS e o topo do conduíte, respectivamente, apresentaram 83,3% de similaridade, enquanto o topo e o fundo do conduíte apresentaram apenas 36,4%. A explicação para esta similaridade foi a contaminação da canaleta reservada para o topo das aparas de conduíte com as amostras do fundo do DHS. A menor riqueza de espécies do fundo do DHS pode estar relacionada à menor concentração de DBO devido ao maior tempo de retenção de sólidos nos espaços intersticiais deste sistema, levando ao aumento das pressões de predação por protozoários, nematódeos e macroinvertebrados, principalmente (WIMPENNY *et al.*, 2000).

5.3.1 Seqüenciamento e identificação das bactérias

Das 95 bandas visualizadas no gel, 47 foram cortadas. A reamplificação por PCR e seqüenciamento somente foram possíveis para 29 das 47 bandas cortadas. Todas as bandas obtidas a partir do gel de DGGE foram seqüenciadas com ambos os *primers* (341F e 907R).

Devido à pequena longitude da maioria das seqüências obtidas (seta na Figura 5.11) e ao alto número de ambigüidades obtidas por limitações da técnica (baixa concentração de DNA molde nas bandas cortadas e ressuspensas, possível dano à estrutura do DNA por exposição à luz ultravioleta, e repetidas amplificações por PCR), apenas 13 seqüências foram identificadas. Este número de bandas está coerente com o encontrado em estudos de diversidade microbiana de sistemas de tratamento de esgotos (BOON *et al.*, 2002; MUYZER *et al.*, 1993). Uma forma de obter seqüências mais “limpas” seria clonar as bandas cortadas e analisar os clones, mas este procedimento pode ser extremamente trabalhoso e de custo elevado quando comunidades complexas são investigadas (DIEZ *et al.*, 2001).

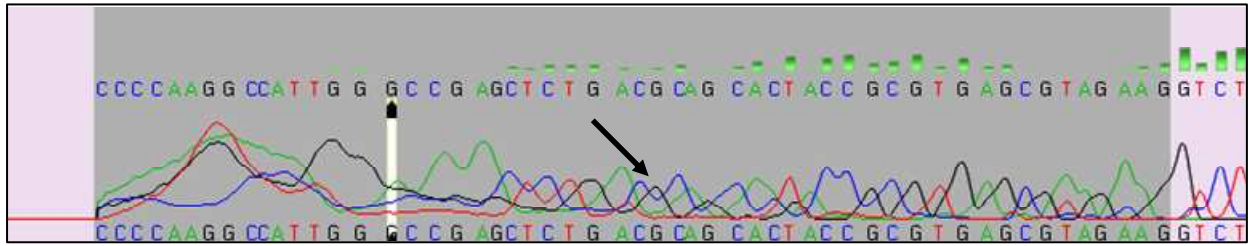


Figura 5.11. Cromatograma da sequência b18 gerado pelo software DNA Baser. Região comum aos *primers* 341F e 907R.

Os resultados obtidos das identificações mediante análise das 13 seqüências apresentaram alta porcentagem de similaridade com as seqüências do banco de dados internacional NCBI (Tabela 5.3). De acordo com a teoria da técnica de DGGE, bandas localizadas na mesma altura pertencem à mesma espécie por apresentarem o mesmo comportamento de *melting*, sendo assim relacionadas filogeneticamente (MUYZER *et al.*, 1993). Isto foi comprovado pelas bandas b19 e b40, localizadas na mesma altura, correspondentes à espécie não-cultivada *clone 8-4N6*, proveniente de amostras fecais de gado de corte.

Uma limitação da técnica de DGGE é a ocorrência de comportamentos de *melting* semelhantes entre espécies não-relacionadas filogeneticamente, como observado neste estudo para as bandas b6 e b20, correspondentes às espécies *Leucobacter* sp. e uma bactéria não-cultivada, respectivamente. Estas espécies, por possuírem seqüências similares no trecho analisado, podem ter mesma mobilidade eletroforética (co-migração para uma posição comum) (MUYZER *et al.*, 1993). Estes resultados ressaltam a importância em cortar mais de uma banda na mesma altura, para evitar a subestimação da diversidade de microrganismos.

Outra restrição da técnica de DGGE é a identificação de bactérias de uma mesma espécie em alturas distintas. Isto ocorreu para as bandas b8 e b22, que apresentaram mais de 98% de similaridade com uma *Actinobacteria* não cultivada (proveniente do mesmo digestor mesófilo anaeróbio onde foram isoladas as seqüências similares às das bandas b18, b20 e b43). Isto ocorreu porque um organismo pode produzir mais de uma banda de DGGE devido aos múltiplos e heterogêneos operons do RNAr.

As fontes das espécies encontradas no NCBI são coerentes com as estudadas (ETEs), como por exemplo, a banda b7, correspondente a uma espécie de bactéria oxidadora de metano não-cultivada, originária de um sistema DHS fechado (HATAMOTO *et al.*, 2009).

Tabela 5.3. Classificação das bandas seqüenciadas da DGGE para o domínio *Bacteria*, mediante análise comparativa entre o BLAST e a base de seqüências do NCBI.

Material suporte/altura	Seqüências	Número - NCBI	Identificação	Grupo taxonômico	% de simil.	Origem
Escória - topo	B1	gb FJ879045.1 	Uncultured bacterium clone R-9249	<i>Bacteria</i>	95	Fezes de rato com dieta controlada
Escória - meio	B6	EF362778.1	<i>Leucobacter</i> sp. Ch1	<i>Actinobacteria</i>	99	Solos contaminados com minério - bactéria redutora de cromato
Escória - meio	B8	emb CU920657.1 	Uncultured <i>Actinobacteria</i> bacterium 1	<i>Bacteria</i>	98	Digestor anaeróbio mesofílico que trata lodos de esgotos domésticos
Escória - fundo	B18	emb CU918169.1 	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium 1	<i>Firmicutes</i>	100	Digestor anaeróbio mesofílico que trata lodos de esgotos domésticos
Anéis plásticos - topo	B16	gb EU196634.1 	<i>Phormidium</i> cf. <i>subfuscum</i> fRoc	<i>Cyanobacteria</i>	97	ND
Anéis plásticos - topo	B7	gb AB504575.1 	Uncultured bacterium	<i>Bacteria</i>	98	Reator de DHS - oxidação de metano
Anéis plásticos - meio	B19	gb FJ682922.1 	Uncultured bacterium clone 8-4N6	<i>Bacteria</i>	100	Amostra fecal de gado de corte MARC
Anéis plásticos - meio	B20	emb CU920570.1 	Uncultured unclassified bacterium	<i>Bacteria</i>	99	Digestor anaeróbio mesofílico que trata lodos de esgotos domésticos
Anéis plásticos - meio	B22	emb CU920657.1 	Uncultured <i>Actinobacteria</i> bacterium	<i>Actinobacteria</i>	99	Digestor anaeróbio mesofílico que trata lodos de esgotos domésticos
DHS - topo	B43	emb CU921640.1 	Uncultured <i>Actinobacteria</i> bacterium	<i>Actinobacteria</i>	98	Digestor anaeróbio mesofílico que trata lodos de esgotos domésticos
DHS - topo	B42	gb GQ871550.1 	Uncultured bacterium clone UTFS-R12-90-53	<i>Bacteria</i>	98	Sequencing batch reactor (SBR)
DHS - meio	B40	gb FJ682922.1 	Uncultured bacterium clone 8-4N6	<i>Bacteria</i>	100	Amostra fecal de gado de corte MARC
DHS - fundo	B44	gb DQ413078.1 	Uncultured bacterium clone 19	<i>Bacteria</i>	98	Reator SBR anaeróbio/aeróbio

Além desta, foram detectadas várias espécies provenientes de reatores aeróbios/anaeróbios SBR (bactéria não-cultivada, clone UTFS-R12-90-53) e de digestores mesófilos anaeróbios que tratam esgotos domésticos (*Actinobacteria* e *Firmicutes* não-cultivados) com alta porcentagem de similaridade (>98%) com as seqüências do NCBI. Estes resultados destacam a presença de microambientes anóxicos e anaeróbios nos filtros estudados, como proposto no item 5.2, quando se detectou *Thiobacillus denitrificans* em amostras de biofilme dos sistemas DHS e aparas de conduíte pela técnica de hibridação *in situ* (FISH).

Nenhuma das seqüências obtidas mostrou similaridade à subclasse das β -*Proteobacteria*, não pelo fato de estarem ausentes no reator, pois AOB foram evidenciadas em grande abundância relativa pela técnica FISH (item 5.2), mas porque o número de bandas geradas no gel de DGGE pode não ter refletido exatamente o número de seqüências diferentes presentes nas amostras.

No topo do FBP preenchido por anéis plásticos foi detectada a cianobactéria *Phormidium* spp. Estas cianobactérias são unicelulares, fotossintetizantes e costumam se desenvolver em multicamadas na superfície do material suporte de FBP. Lessard e Bihan (2003) relataram que a cianobactéria *Phormidium cyanobacterium* é responsável pelo decréscimo da eficiência dos processos de remoção e pelo entupimento de FBP. Ademais, esta camada de organismos fotossintetizantes é um ambiente favorável para a reprodução de moscas, que são um grande incômodo quando emergem. Apesar das diversas armadilhas das análises de RNAr baseadas em PCR, a realização dos perfis das comunidades bacterianas por PCR-DGGE demonstrou ser um método poderoso, que permite uma análise independente de cultivo de amplo número de amostras de biofilme.

5.3.2 Diversidade bacteriana nos diferentes materiais suporte

As amostras obtidas dos biofilmes dos FBP mostraram ao menos cinco bandas distinguíveis pela boa intensidade. O FBP preenchido por escória apresentou a maior diversidade bacteriana, devido ao maior número de bandas geradas (13 no meio), ao passo que os sistemas compostos pelos anéis plásticos e DHS apresentaram menores quantidades de bandas (11 e 10, respectivamente).

Já o FBP preenchido por aparas de conduíte apresentou a menor diversidade de espécies (5 bandas no fundo, Figura 5.9), apesar de apresentar alta área superficial. O perfil observado no topo do conduíte retrata, na verdade, o fundo do sistema DHS, uma vez que a amostra transbordou de uma canaleta para a outra. Vale ressaltar que este material suporte apresentou

baixa eficiência de remoção de amônia e DBO (ALMEIDA, 2007), fato que pode estar relacionado à menor diversidade bacteriana. O menor número de bandas observadas no conduíte pode estar relacionado à menor retenção de biomassa neste material suporte. A baixa retenção de biomassa pode estar relacionada ao baixo tempo de retenção de sólidos no volume reacional deste FBP, bem como ao menor aproveitamento da área superficial específica devido à taxa de aplicação superficial (TAS) imposta de 10 m³/m².dia.

Os reatores deste trabalho foram alimentados simultaneamente pelo mesmo afluente, proveniente do reator UASB, o que resultou na grande similaridade entre os padrões de bandas dos diferentes materiais de enchimento. Contudo, as diferentes condições ambientais proporcionadas por cada tipo de suporte foram determinantes para que estes padrões de bandas fossem distintos visualmente. Análises de contingência foram realizadas para comprovar se houve diferença significativa entre os materiais suporte com relação à ocorrência de bandas de DGGE, e foram negativas em todas as três profundidades.

Os índices de diversidade de Shannon (H') encontrados (Figura 5.12) comprovaram que a maior diversidade bacteriana foi verificada no FBP preenchido por escória, seguida pelo DHS, anéis plásticos, e por último as aparas de conduíte.

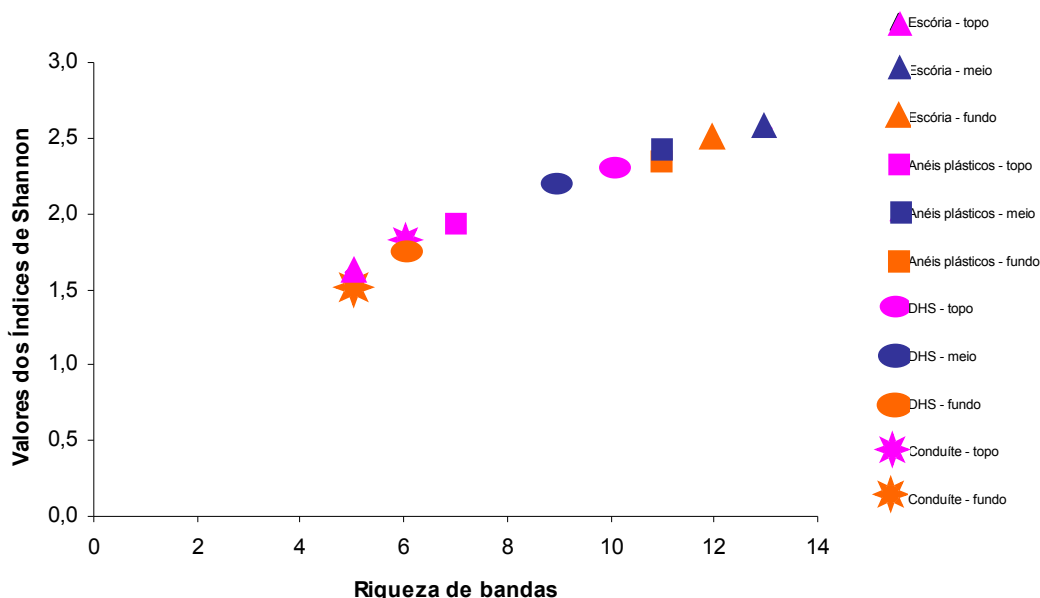


Figura 5.12. Valores dos índices de diversidade de Shannon para amostras de biofilme removidas dos diferentes materiais suporte e profundidades na COV = 0,24 kgDBO/m³.d.

Contudo, os valores de diversidade devem ser tomados apenas como estimativas, pois o uso de metodologias diferenciadas, tamanho amostral e outras variáveis interferem diretamente

sobre o valor destes índices. A exclusão de alguma banda de alta frequência também pode provocar alterações significativas no valor destes índices.

5.3.3 Diversidade bacteriana nas diferentes profundidades dos filtros

A distribuição heterogênea das bandas nas distintas profundidades permite inferir que a ausência, no topo, de algumas bandas encontradas nas outras profundidades pode estar relacionada com as melhores condições encontradas para o desenvolvimento de microrganismos no meio e fundo do reator, como oxigênio dissolvido e relação C:N favorável. De fato, foi verificada uma tendência ao aumento da quantidade de bandas quando se aumenta a profundidade, principalmente do topo para o meio dos FBP. Uma possível explicação para estes resultados é a redução da concentração de matéria orgânica do topo para o fundo dos reatores. Okabe *et al.* (1996), estudando biofilmes de biofiltros submersos, observaram que a alta relação C:N (>1), típica de topos de reatores de fluxo descendente, favorece o desenvolvimento de bactérias heterotróficas. Porém, a presença de luz, e maior concentração de matéria orgânica no topo do reator favoreceram o desenvolvimento de algas, macroinvertebrados, nematódeos (Figura 5.1), que também podem ter sido responsáveis pela diminuição da diversidade de *Bacteria*, por serem predadores da microbiota estudada. Estes resultados estão de acordo com os obtidos pela técnica FISH, discutidos no item 5.2. Os testes ANOVA realizados para as análises quantitativas revelaram que houve aumento da abundância relativa de *Bacteria*, marcadas pela sonda EUB338, do topo para o meio dos reatores.

O desaparecimento e surgimento de bandas distintas à medida que a profundidade aumenta foi observado em todos os FBP. Isto sugere uma sucessão de espécies nesta população, que também foi detectada nos estudos de Rowan *et al.* (2003), que investigavam a diversidade de AOB em dois reatores de tratamento de esgotos diferentes, em escala real, tratando uma mistura de águas residuárias doméstica e industrial.

As análises de contingência (Figura 5.13), e o coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,35 (significativo ao nível 0,05), demonstraram que houve diferença significativa entre as três profundidades, com relação à ocorrência de bandas de DGGE, apenas para o FBP preenchido com escória. No topo foi observada menor quantidade de bandas (5), o meio apresentou 13 bandas e o fundo 12.

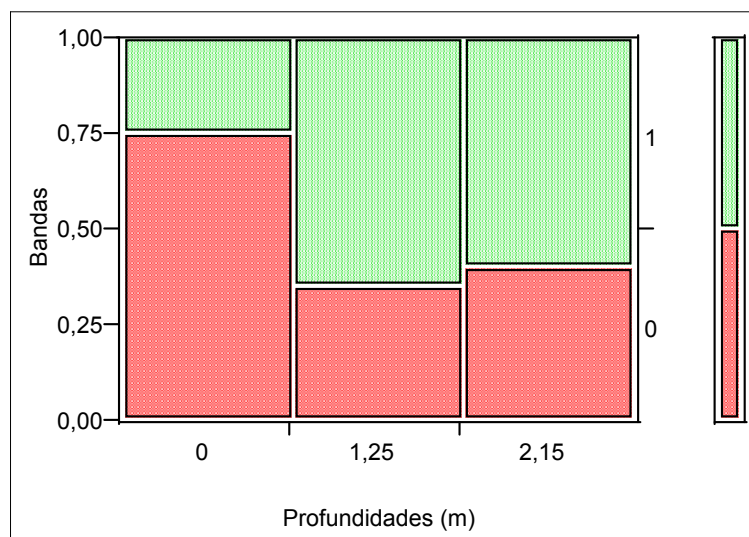


Figura 5.13. Análise de contingência (*Mosaic plot*) para o FBP preenchido por escória. A parte verde do gráfico representa a ocorrência de bandas nas distintas profundidades.

Os índices de diversidade de Shannon (H') encontrados (Figura 5.12) confirmaram os resultados da análise de UPGMA, demonstrando que a diversidade de espécies do meio e fundo da escória é similar. Porém, o índice foi insuficiente para determinar se houve diferença significativa entre as profundidades do material suporte escória, fato este comprovado pelas análises de contingência (Figura 5.13). O meio e fundo dos anéis plásticos apresentaram mesmo H' , evidenciando mesma diversidade de espécies nestas profundidades. Os maiores valores do índice foram verificados no meio da escória, indicando que este ponto apresenta a maior diversidade de espécies encontrada. Em contrapartida, a menor diversidade de microrganismos foi observada no fundo do conduíte, pois o índice de Shannon considera que quanto mais próxima ao zero, mais baixa é a diversidade. O valor de H' mostrou que a diversidade de espécies do topo deste material suporte é bastante similar ao fundo do DHS. Como discutido anteriormente, este fato pode ter ocorrido devido à contaminação da canaleta do topo do conduíte com a amostra do fundo do DHS, devido à semelhança dos padrões de bandas do gel de DGGE.

5.4 Evolução das comunidades microbianas presentes no topo e meio dos diferentes FBP em distintas COV (0,24 e 0,38 kgDBO/m³.dia)

O foco desta parte do trabalho está em verificar a evolução da comunidade microbiana com o aumento da COV de 0,24 kgDBO/m³.dia para 0,38 kgDBO/m³.dia. Para monitorar a reprodutibilidade dos perfis das amostras ao longo do tempo, foram monitoradas as fases 2 e 3 de mesma COV (0,38 kgDBO/m³.dia), porém com um intervalo de aproximadamente um ano entre uma coleta e outra. Para tanto, foram realizados dois géis de DGGE: um do topo dos quatro reatores nas três fases, e um do meio nas mesmas condições.

O DNA genômico foi eficazmente extraído das amostras de biofilme coletadas nos topos e meios de todos os FBP nas três fases de operação. Os DNA das amostras do fundo dos reatores foram eficientemente extraídos, porém apresentaram problemas em ser amplificados com os *primers* utilizados. Este fato não agrega erros sistemáticos ao resultado final deste estudo, uma vez que as análises de UPGMA apresentadas no item 5.3.3, entre outras, demonstraram que o meio e fundo dos reatores apresentam alta semelhança. A integridade do DNA genômico total extraído foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, usando o marcador de peso molecular *Ladder* (Figura 5.14A).

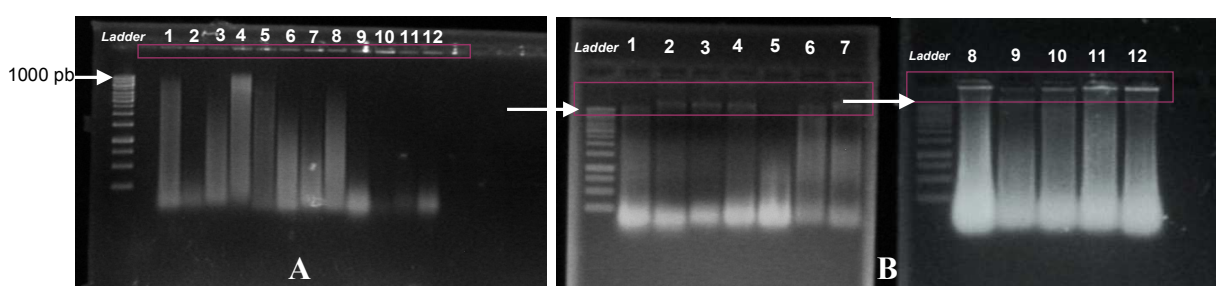


Figura 5.14. Eletroforeses de extratos de DNA genômico de amostras de biofilmes: A) do topo dos quatro FBP nas três fases de operação. 1-4: Fase 1 - 1. escória, 2. anéis plásticos, 3. DHS, 4. conduíte; 5-8: Fase 2 - 5. escória, 6. anéis plásticos, 7. DHS, 8. conduíte; 9-12: Fase 3 - 9. escória, 10. anéis plásticos, 11. DHS, 12. conduíte; B) do meio dos reatores.

As seqüências do gene DNAr 16S do domínio *Bacteria* foram amplificadas por PCR com o par de *primers* gerais 341F-GC/907R. A utilização de um tampão especial (Tampão IVB, Phoneutria) ocasionou na eliminação das bandas inespecíficas nos géis das reações de PCR, comparados aos obtidos no gel citado acima. A característica do tampão que permitiu estes melhores resultados (Figura 5.14B), é que o magnésio é liberado aos poucos no sistema, resultando em uma concentração crescente de magnésio livre ao longo dos ciclos da reação de PCR. A concentração máxima de magnésio que pode ser atingida na reação é de 3,5 mM.

Porém, dependendo do número de ciclos, esta nem sempre é atingida, e a concentração máxima que geralmente é alcançada é de aproximadamente 2 mM.

O tamanho correto dos amplicons, 566 pares de bases, foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o marcador de peso molecular *Ladder* 1000 pb (Figura 5.15).

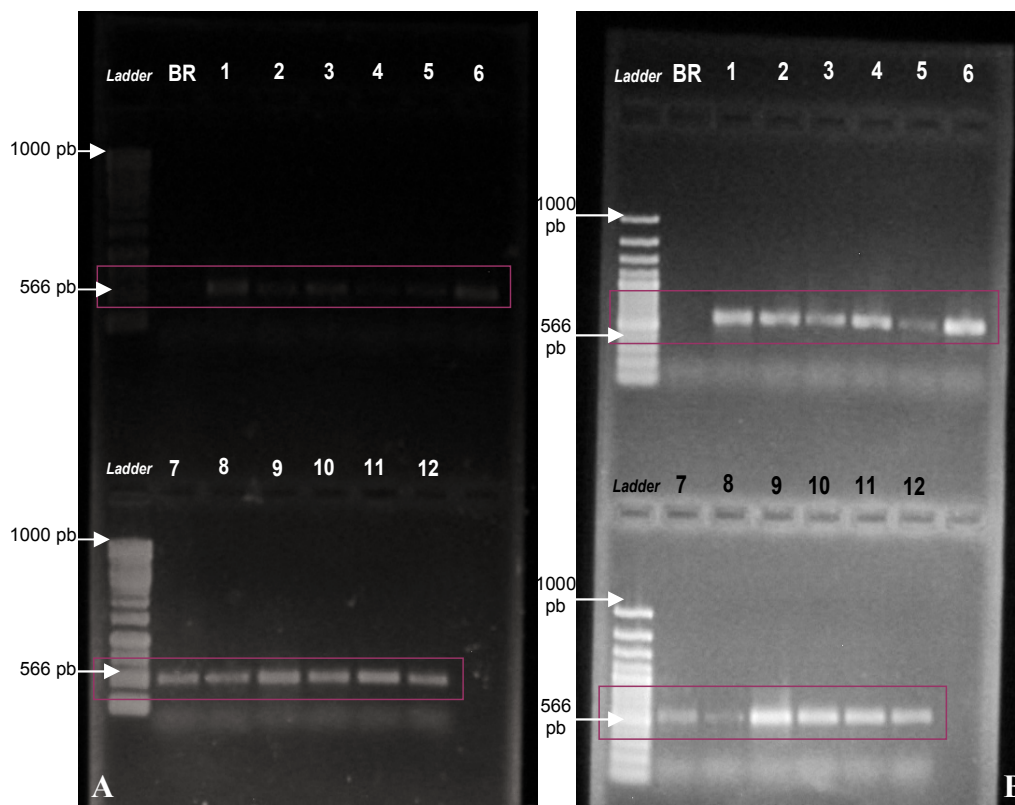


Figura 5.15. Eletroforese de amplicons da PCR com *primers* para domínio *Bacteria*, destinados à DGGE em géis de agarose 1%. A) amostras de biofilme do topo dos quatro FBPs nas três fases de operação. 1-4: Fase 1 - 1. escória, 2. anéis plásticos, 3. DHS, 4. conduíte; 5-8: Fase 2 - 5. escória, 6. anéis plásticos, 7. DHS, 8. conduíte; 9-12: Fase 3 - 9. escória, 10. anéis plásticos, 11. DHS, 12. conduíte; B) amostras de biofilme do meio dos quatro FBP nas três fases de operação.

A sensibilidade de detecção de variantes de seqüências de DNAr 16S pela DGGE foi demonstrada pelas diferentes intensidades e números de bandas observadas nos perfis das diferentes populações aqui estudadas. Pela visualização dos géis de DGGE do topo e meio dos filtros (Figura 5.16), nas diferentes fases de operação, observou-se a presença de várias bandas distinguíveis no padrão de separação, provavelmente derivadas de diferentes espécies de bactérias constituindo as populações. Bandas comuns aos diferentes FBP e as distintas COV foram visualizadas no gel, sugerindo a dominância de uma bactéria que desempenha uma função essencial ao processo.

Os *primers* utilizados neste estudo são específicos para todas as *Bacteria*, mas outros *primers* podem ser utilizados para determinar a diversidade de outras espécies não amplificadas neste estudo. Grupos específicos de *Bacteria*, como as AOB, por exemplo, não foram detectadas no gel de DGGE para o domínio *Bacteria* discutido no item 5.3. Porém, com a utilização de *primers* específicos para o gene funcional *amoA* e para RNAr 16S estas foram amplificadas. Estes resultados são abordados no item a seguir.

Os géis de DGGE para domínio *Bacteria* do topo e meio dos reatores resultaram em 64 e 58 bandas, respectivamente. Destas, 32 bandas do topo e 27 do fundo dos reatores foram cortadas, purificadas, reamplificadas e enviadas para seqüenciamento. Os resultados das identificações das espécies não serão apresentados neste trabalho.

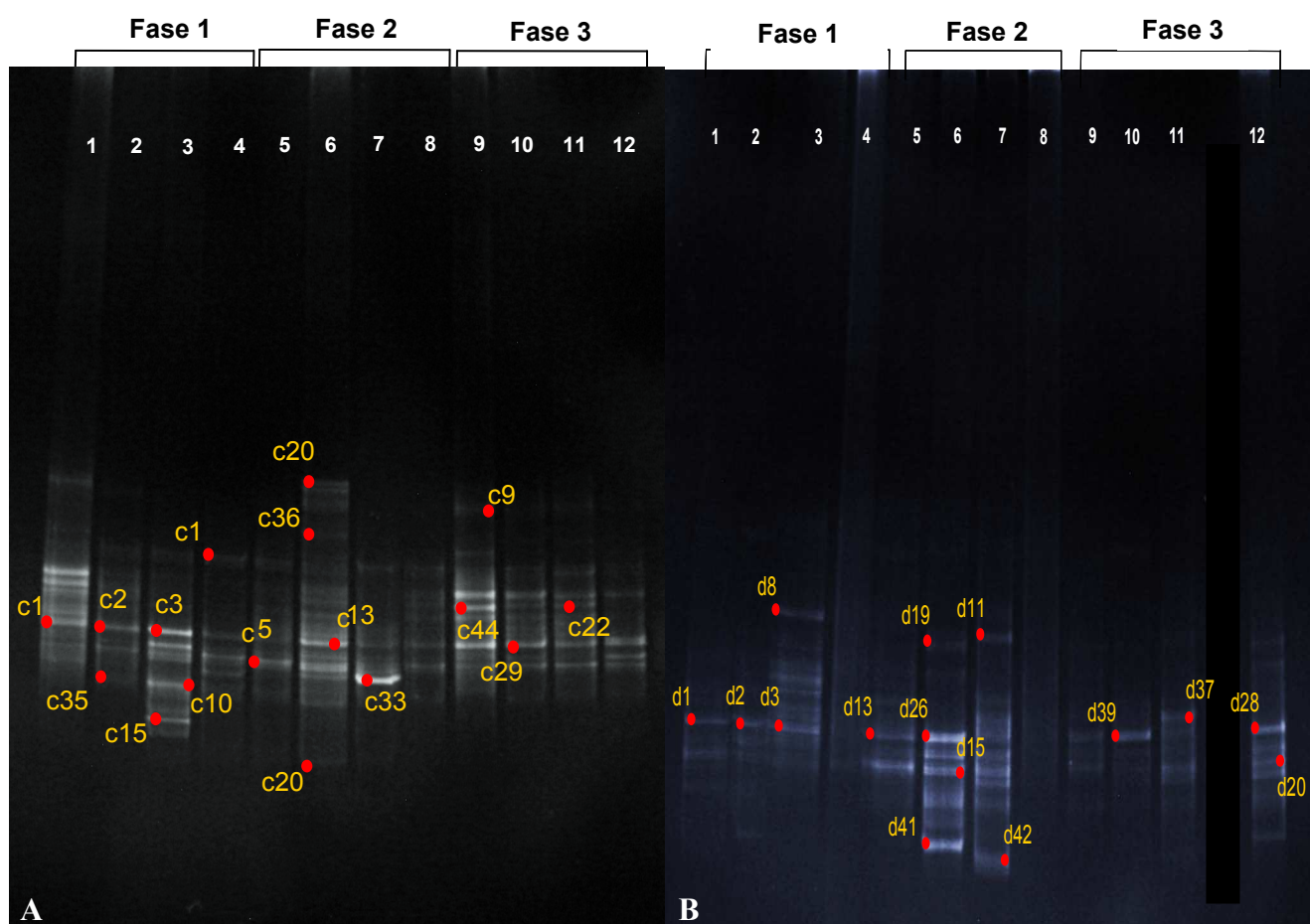


Figura 5.16. Géis de DGGE para o domínio *Bacteria* dos biofilmes coletados: A) no topo dos quatro materiais suporte (os números indicam bandas cortadas, reamplificadas e seqüenciadas). Amostras coletadas nas três fases de operação. 1-4: Fase 1 - 1. escória, 2. anéis plásticos, 3. DHS, 4. conduíte; 5-8: Fase 2 - 5. escória, 6. anéis plásticos, 7. DHS, 8. conduíte; 9-12: Fase 3 - 9. escória, 10. anéis plásticos, 11. DHS, 12. conduíte; B) no meio dos quatro materiais suporte (Zoom de 13.4x).

Pela observação das Figuras 5.16A (bandas c1, c2, c13 e c29) e 5.16B (bandas d1, d2, d26 e d39), detectou-se a dominância de comunidades bacterianas, mesmo com o aumento da COV

da fase 1 para 2 e 3, e também ao longo do tempo em uma mesma COV, da fase 2 para 3. Estas espécies provavelmente desempenharam um importante papel na formação e estabilização dos biofilmes nos diferentes materiais suporte. Estes resultados sugerem que a dominância de espécies particulares de bactérias não é requerida na formação dos biofilmes. De preferência, os biofilmes podem ser formados a partir do crescimento de bactérias comumente presentes em sistemas de tratamento de esgoto doméstico.

Vale lembrar que apesar de os reatores terem sido alimentados pelo mesmo efluente do reator UASB em todas as fases operadas, os biofilmes formados no presente experimento apresentaram grande diversidade de espécies entre um material suporte e outro. Este fato foi confirmado pelo cálculo dos índices de diversidade de Shannon (H') apresentados nas Figuras 5.17 (topo dos filtros) e 5.18 (meio dos filtros). As diversidades de espécies dos diferentes materiais suporte variaram em um mesmo padrão para as fases 1 e 2. O conduíte foi o material suporte que apresentou menor diversidade de microrganismos em todas as fases de operação, o que pode ser atribuído à dificuldade de aderência do biofilme a este material suporte. Estes resultados estão de acordo com os da técnica FISH, discutida no item 5.2, onde foi observado que o conduíte apresentou as menores contagens de microrganismos para todas as sondas utilizadas.

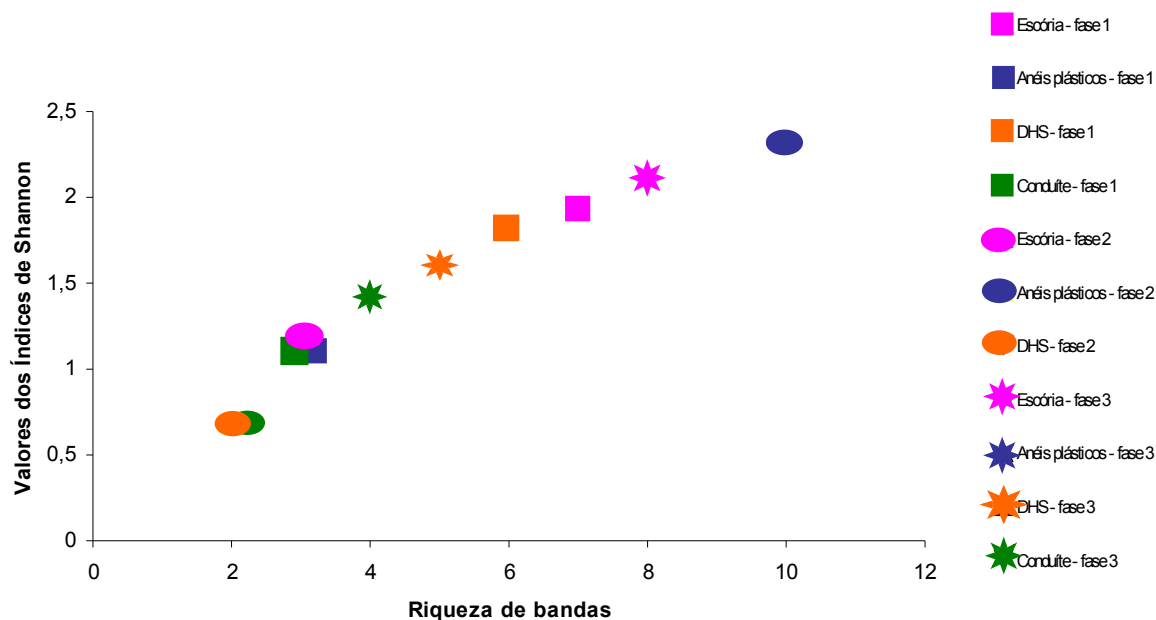


Figura 5.17. Valores dos índices de Shannon para o topo dos diferentes filtros biológicos percoladores nas três fases de operação.

O índice de diversidade H' descreve a mudança da dominância de espécies de uma comunidade bacteriana. Nos quatro reatores, os índices de diversidade variaram ao longo da

operação das três fases. Observou-se a semelhança da evolução da comunidade bacteriana nos biofilmes dos materiais suporte escória, DHS e aparas de conduíte. Estes apresentaram uma grande redução da diversidade bacteriana da fase 1 para 2, quando houve o aumento da COV, seguida de um grande aumento das diversidades da fase 2 para 3, com a COV constante. O comportamento inverso foi verificado para os reatores preenchidos por anéis plásticos. A diversidade aumentou bastante da fase 1 para a 2, e diminuiu moderadamente da 2 para a 3.

É amplamente discutido que a COV tem um considerável impacto na seleção de espécies durante o estabelecimento do biofilme. O efeito do choque de carga orgânica na estrutura da comunidade microbiana já foi descrita anteriormente por Fernandez *et al.* (2006), que investigando a granulação de lodos anaeróbios verificaram que o aumento da COV resulta em menor diversidade de espécies. Os resultados obtidos por estes autores estão de acordo com os aqui descritos.

O aumento da profundidade na extensão dos reatores ocasiona no decréscimo da COV devido à remoção do substrato pela comunidade de organismos heterotróficos associados aos biofilmes. A Figura 5.18 mostra as variações das diversidades das comunidades de bactérias nesta profundidade dos FBP.

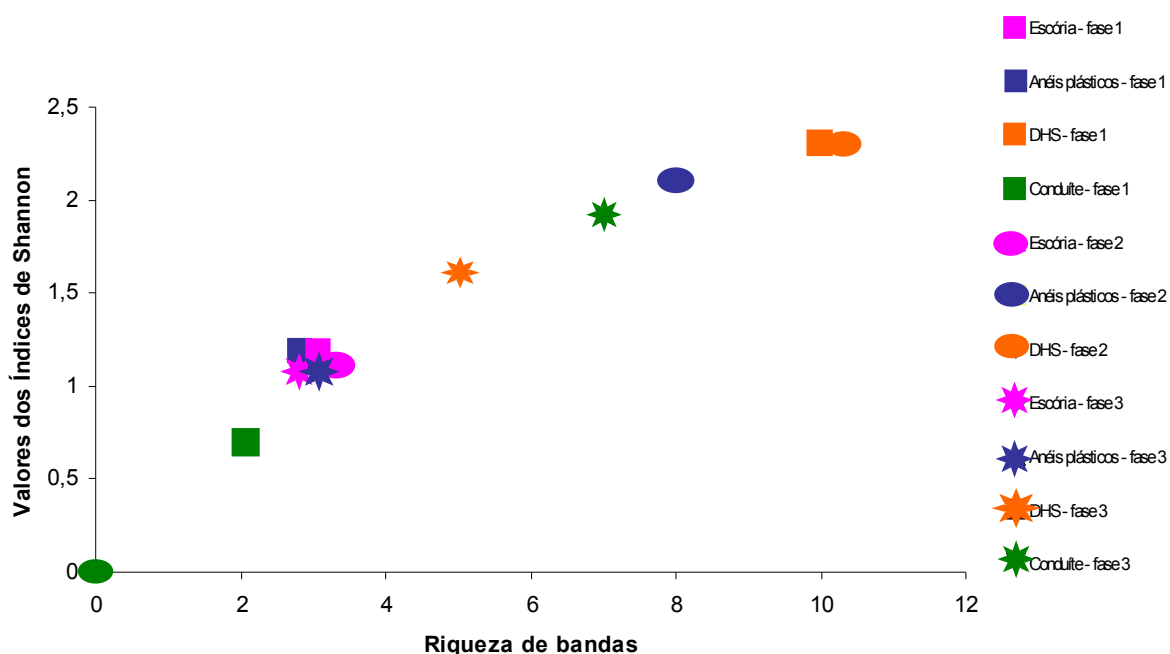


Figura 5.18. Valores dos índices de Shannon para o meio dos diferentes filtros biológicos percoladores nas três fases de operação.

No presente estudo, a carga de substrato orgânico pareceu ser responsável pela seleção de espécies e dominância de comunidades microbianas nos reatores, uma vez que os padrões de

diversidade bacteriana variaram entre as profundidades e fases estudadas. É possível que algumas bactérias importantes tenham contribuído para sustentar a estrutura dos biofilmes e também na formação e maturação destes, uma vez que se verificou a presença de bandas constantes em todos os materiais suporte nas três fases de operação dos reatores (Figura 5.16B, bandas d1, d2, d26, d28 e d39).

O FBP preenchido por aparas de conduíte apresentou um comportamento atípico, tendo em vista os resultados das análises de FISH e a discussão do item acima, quando a menor diversidade bacteriana entre todos os sistemas foi atribuída ao conduíte. Este material, comparado aos outros estudados, mostrou a maior diversidade de espécies na fase 3, fato este possivelmente atribuído às matrizes biológicas que se formam na superfície do suporte, pelo acúmulo de biofilmes resultantes do descolamento dos biofilmes antigos ao longo dos FBP.

Os materiais suporte apresentaram padrões distintos de diversidade de espécies. No sistema DHS foi verificada a maior diversidade na fase 1, enquanto a escória e os anéis plásticos apresentaram mesma riqueza de espécies. Na fase 2 a diversidade de bactérias da escória permaneceu a mesma, enquanto a dos anéis plásticos aumentou consideravelmente, se aproximando à do sistema DHS. A escória apresentou a mesma diversidade de espécies em todas as fases.

A DGGE, como uma técnica para o estudo da ecologia molecular microbiana, pode ser considerada uma excelente ferramenta para investigar a evolução de comunidades microbianas em diferentes condições operacionais, como o aumento da COV e a evolução das comunidades ao longo do tempo. O subsequente seqüenciamento de fragmentos de DNAr 16S re-amplificados por PCR apresentou bons resultados, demonstrando que a metodologia DGGE - seqüenciamento é eficiente, e a clonagem intermediária a estas etapas se torna desnecessária, se a técnica for desenvolvida cautelosamente.

5.5 Distribuição das comunidades de AOB presentes nos biofilmes das diferentes profundidades dos FBP em distintas COV (0,24 e 0,38 kgDBO/m³.dia)

Foi proposto recentemente que o nível de diversidade de AOB encontrado em um reator está diretamente relacionado à estabilidade do mesmo. Sendo assim, um sistema operado com maior diversidade de AOB pode significar na melhoria do desempenho dos reatores, por aumentar a resistência às perturbações na nitrificação, enquanto monoculturas de AOB em uma ETE podem implicar na maior susceptibilidade do processo às condições adversas, como picos de COV, por exemplo.

Em sistemas de tratamento de esgoto (em escala real ou de bancada) pode haver a predominância de uma única população de AOB ou várias diferentes populações podem ocorrer juntas. Portanto, necessitamos compreender melhor quais são as condições ambientais proporcionadas pelos materiais suporte e de operação dos reatores que selecionam as AOB mais adequadas para o sistema, e assim, promovem o aumento da riqueza de espécies.

Há divergências quanto à utilização dos *primers* específicos para AOB baseados na sequência do RNAr 16S (CTO189F/ CTO654R) e a do gene da enzima amônia monooxigenase (*amoA*) (*amoA*-1F e *AmoA*-2R - Rotthauwe *et al.* (1997). Nicolaisen *et al.* (2002) encontraram maior diversidade de AOB utilizando o par de *primers* que amplifica um fragmento da subunidade A do gene *amoA*. O gene está presente em todas as AOB autotróficas e acredita-se que contém informação suficiente para a realização de inferências filogenéticas fundamentadas na sua sequência, sendo assim considerado um excelente marcador molecular (PURKHOLD *et al.*, 2000).

Considerando que a reprodutibilidade das PCR iniciais é de crucial importância para a confiabilidade das análises de DGGE subsequentes, e que os resultados obtidos a partir da amplificação do gene funcional não foram satisfatórios, foi utilizada também a PCR com os *primers* para RNAr 16S. Amplicons de aproximadamente 491pb (*AmoA* 1F/ *AmoA* 2R) e 465pb (CTO189F/ CTO654R) foram obtidos a partir do DNA genômico de todas as profundidades de todos os FBP, nas três fases (Figura 5.19). Os géis de DGGE não resultaram em perfis de qualidade, embora algumas amostras tenham apresentado concentrações suficientes de DNA (1 a 3 g de DNA) para a obtenção de um bom gel. Contudo, os resultados apresentados são suficientes para a discussão de alguns pontos importantes.

A utilização direta de *primers* para DGGE (com grampo GC) para amplificar DNA ambiental

freqüentemente resulta no aparecimento de bandas inespecíficas, como descrito no trabalho de Nicolaisen *et al.* (2002). Portanto, comparamos neste trabalho, a estratégia semi-nested PCR, que compreende uma PCR inicial sem grampo GC, seguida de outra PCR com o grampo GC, e a PCR normal (Figura 5.19). Os *primers* utilizados foram escolhidos com base no estudo de Nicolaisen *et al.* (2002).

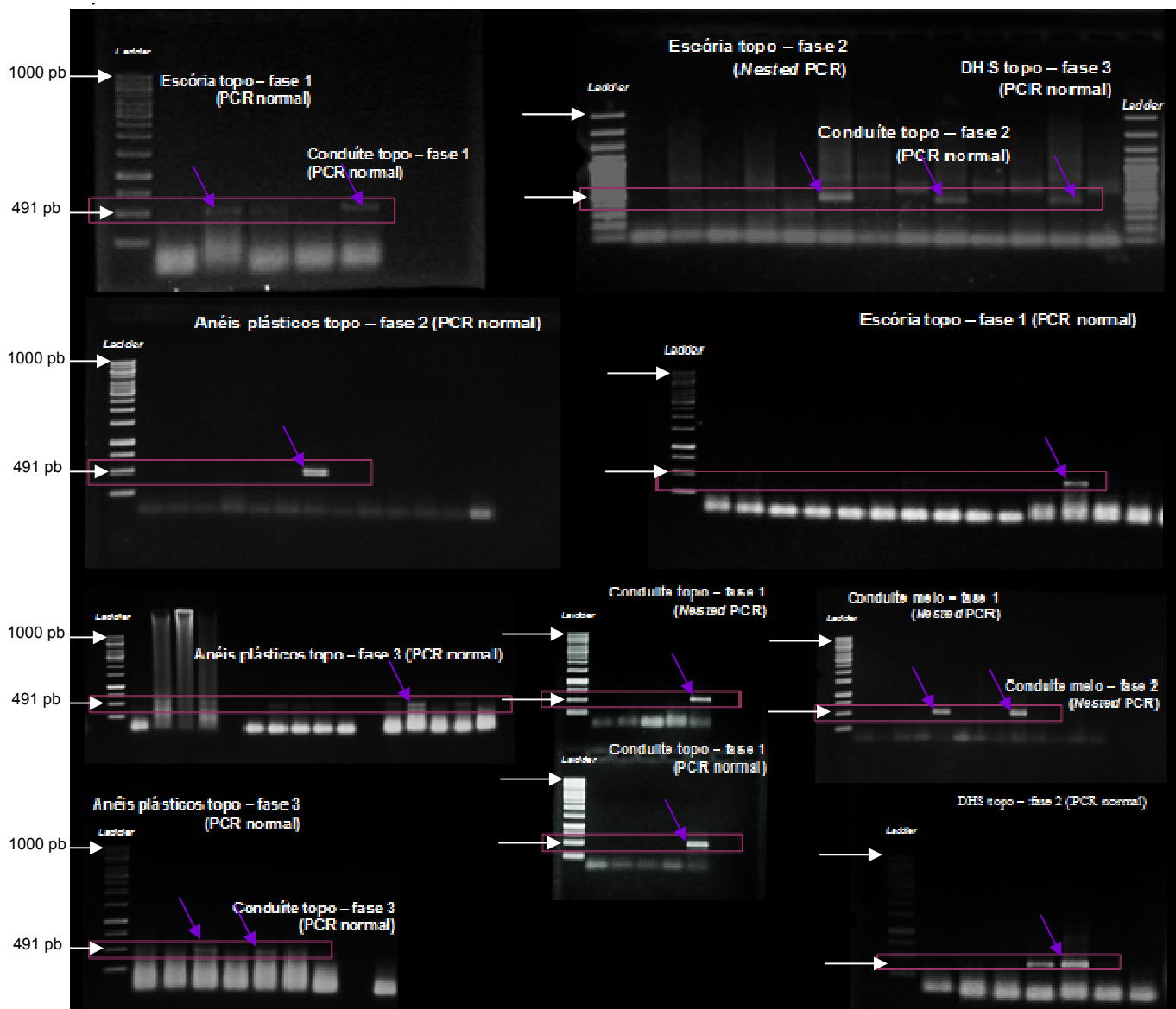


Figura 5.19. Eletroforeses de amplicons resultantes da PCR com *primers* específicos para o gene funcional *amoA* em géis de agarose 1%.

A partir da observação da Figura 5.19, se concluiu que as PCR normal e semi-nested apresentaram a mesma qualidade de ampliações, quanto ao *primer amoA*. Entretanto, as seqüências de RNAr 16S somente foram amplificadas utilizando o *primer* CTO sem o grampo GC, e as próximas PCR com o grampo, ideais para a realização das DGGE, foram negativas, tornando este par de *primers* ineficiente para cumprir o objetivo deste item (Figura 5.20).

Ademais, as amostras do fundo dos reatores não foram amplificadas com sucesso em ambas as fases, enquanto as amostras do topo apresentaram grande frequência de resultados positivos.

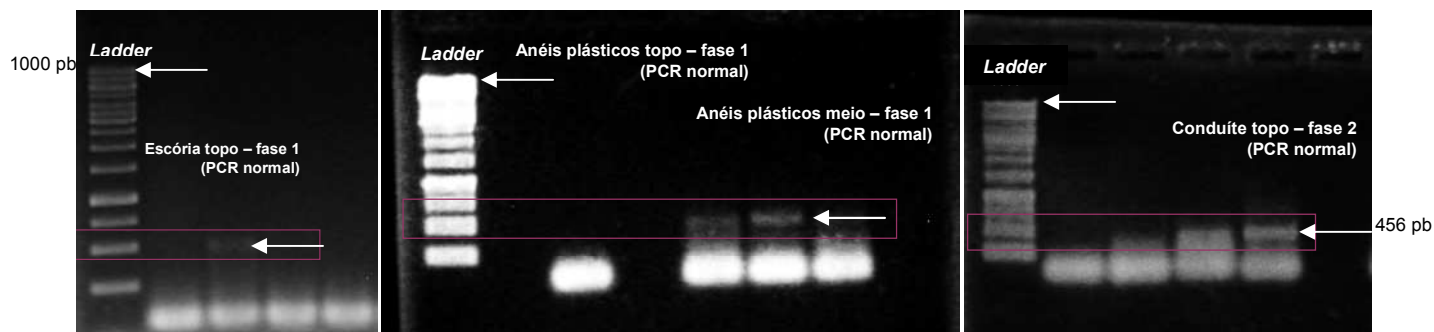


Figura 5.20. Eletroforeses de amplicons resultantes da PCR com *primers* específicos para o gene RNAr 16S, em géis de agarose 1%.

Pela comparação dos géis resultantes das ampliações (Figuras 5.19 e 5.20), pode-se concluir que a sensibilidade dos *primers amoA* para a caracterização de comunidades de AOB é altamente superior à dos *primers CTO* para RNAr 16S. A amplificação destes não foi realizada com sucesso, apresentando baixa frequência de resultados positivos.

5.6 Construção da biblioteca genômica do FBP preenchido por DHS na COV = 0,24 kgDBO/m³.dia

A biblioteca genômica de RNAr 16S do domínio *Bacteria* foi construída a partir da mistura dos extratos de DNA genômico das três profundidades do FBP preenchido por DHS na fase 1. Este filtro foi selecionado por ter apresentado os melhores resultados qualitativos e quantitativos de microrganismos nas outras técnicas utilizadas, e também a melhor eficiência de remoção de amônia. Esta escolha foi realizada para reduzir o número amostral, pelo fato de a clonagem ser uma técnica laboriosa e de alto custo.

Os extratos de DNA genômico foram amplificados por PCR com o par de *primers* universal para o domínio *Bacteria* 27F/1492R. A integridade do DNA genômico total extraído e o tamanho correto dos produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1%, usando o marcador de peso molecular fago ϕ 29 digerido com a enzima *Hind III* (Figuras 5.21A e 5.21B, respectivamente).

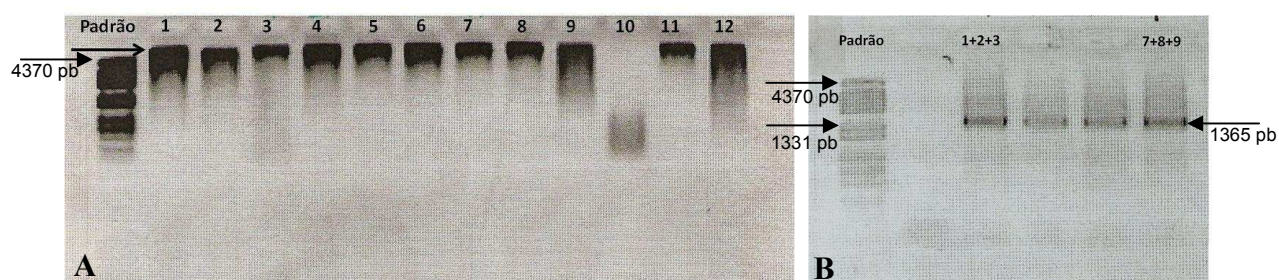


Figura 5.21. Eletroforese de DNA em géis de agarose 1%. A) extratos de DNA genômico de amostras de biofilme dos quatro FBP nas três alturas. Linhas 7-9: DHS; 7. topo, 8. meio, 9. fundo B) amplicons de DNAr 16S destinados à clonagem, obtidos dos extratos de DNA genômico do biofilme de três profundidades do DHS. Amostras coletadas na primeira fase de operação.

Os amplicons resultantes da PCR com os *primers* 27F e 1492R foram inseridos em vetores plasmidiais (TOPO 2.1, Invitrogen), e os produtos destas ligações vetor/inserto foram introduzidos em células competentes de *Escherichia coli* (DH5 α) – transformação. Os plasmídios portadores do fragmento de interesse, evidenciados pela coloração branca das colônias crescidas em meio LB/ampicilina (Figura 5.22), foram isolados para o seqüenciamento do inserto de RNAr 16S. As colônias azuis foram descartadas, por indicarem que as bactérias competentes não receberam o inserto de RNAr 16S, apesar de terem recebido o plasmídio com o gene de resistência a ampicilina. O gene *lacZ*, nesta situação, é expressado e codifica a enzima β -galactosidase, que cliva o componente x-gal presente no meio LB/ampicilina, produzindo um composto azul insolúvel responsável pela coloração azul das colônias.

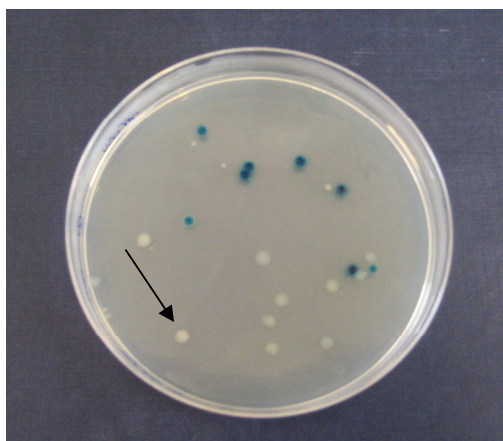


Figura 5.22. Placa de meio LB/ampicilina. As colônias brancas, indicadas pela seta, indicam a presença do vetor/inserto nas células competentes de *E. coli* DH5 α .

Ao final do processo de clonagem da amostra de biofilme do FBP preenchido por DHS, 96 clones foram obtidos. Os insertos destes clones foram agrupados em padrões semelhantes de digestão enzimática (ARDRA), e assim, 54 padrões considerados distintos foram sequenciados. A longitude das sequências resultantes variou na faixa de 150 a 830 nucleotídeos, e a maioria delas, de má qualidade (48%), não entrou na construção da árvore filogenética. Apenas 33% das sequências apresentaram mais de 700 nucleotídeos.

Para a construção da árvore filogenética, os clones de perfis semelhantes foram agrupados em OTU (*Operational Taxonomic Unit*), com mais de 97% de similaridade. Assim, algumas OTU foram constituídas de um único clone, enquanto outras foram formadas por mais de um clone. A Tabela 5.4 apresenta os clones classificados em OTUs das amostras de biofilme do FBP preenchido por DHS na fase 1 de operação, utilizados na construção da árvore filogenética.

Apenas as 18 OTU (representando 29 clones) que apresentaram mais de 700 nucleotídeos foram utilizadas na construção da árvore filogenética (Figura 5.23). Os clones presentes na árvore foram relacionados em 89 % a 99% de similaridade aos grupos encontrados neste trabalho.

Tabela 5.4. Clones do FBP preenchido por DHS na COV = 0,24 kgDBO/m³.d. classificados em unidades taxonômicas operacionais (OTU).

OTU	CLONES	OTU	CLONES
DHS 1	1	DHS 46 *	46
DHS 2 *	2, 25	DHS 47 *	47
DHS 3 *	3, 31, 71	DHS 48	48
DHS 4 *	29, 69, 70, 90	DHS 49	49
DHS 5 *	5	DHS 51	51, 53
DHS 6	7, 8	DHS 52 *	52
DHS 26	28, 41	DHS 54	54
DHS 30 *	30	DHS 57 *	57
DHS 32 *	32	DHS 60	60
DHS 33 *	33	DHS 61 *	61
DHS 34 *	34	DHS 65	65, 67
DHS 36 *	36, 44, 59, 62, 63, 64, 66	DHS 68 *	68
DHS 38 *	38	DHS 72 *	72
DHS 43	43	DHS 80 *	80

* OTU utilizadas na construção da árvore filogenética

Os clones foram comparados com a base de dados de sequências de DNAr 16S do NCBI (National Center for Biotechnology Information, EEUU, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e foram classificados, mediante a criação de grupos de diferentes afiliações filogenéticas. As amostras foram alinhadas com outras sequências de mesma afiliação taxonômica em nível de filo ou classe. Tais valores estão apresentados na Tabela 5.5, bem como as unidades taxonômicas operacionais (OTU), números de acesso no NCBI e as suas descrições.

De acordo com os resultados obtidos, a diversidade da comunidade microbiana afiliada ao domínio *Bacteria* foi relativamente baixa no sistema DHS, tendo sido identificados membros de quatro linhagens filogenéticas maiores distintas. Os clones (total de 29) presentes no FBP foram semelhantes a quatro diferentes filios (Figura 5.23), sendo que *Actinobacteria* apresentou a maior quantidade de clones (55%), seguido por Firmicutes (34%) e α – Proteobacteria (10%). Apenas um clone foi relacionado ao filo Chlorobi.

Seis OTU (15 sequências obtidas a partir da clonagem) foram relacionadas ao filo *Actinobacteria*, grupo filogenético mais abundante no sistema DHS (Tabela 5.5). Estas bactérias são gram-positivas de alto índice de G+C, e muitas delas podem ser altamente pleomórficas apresentando ocasionalmente crescimentos filamentosos parecidos com fungos (TORTORA, 2008).

Tabela 5.5. Classificação das OTU sequenciadas da clonagem para o domínio *Bacteria* do FBP preenchido por DHS na COV = 0,24 kgDBO/m³.d, mediante análise comparativa entre o BLAST e a base de seqüências do NCBI.

OTU	Clones correspondentes	Número - NCBI	Identificação	Phylum/Classe	Similaridade	Origem
DHS 2	2, 25	gij192982622 EU775645.1 gij219846899 NR_026491.1	Uncultured bacterium clone HH_aai33b07 <i>Clostridium sporadicum</i>	Firmicutes	97%	Intestino de mamíferos
DHS 3	3, 31, 71	gij191093763 DQ445859.1	<i>Eubacterium tenue</i> strain ATCC 25553	Firmicutes	97%	Microbiota fecal humana
DHS 4	29, 69, 70, 90	gij46093304 AB113594.1	Uncultured actinobacterium	Firmicutes	99%	Microbiota fecal humana
DHS 5	5	gij222119371 AB478415.1	<i>Chlorobi</i> bacterium Mat9-16	Actinobacteria	96%	Águas subterrâneas em minas de ouro Periferia de colônias de bactérias verdes sulfurosas
DHS 30	30	gij253970975 GQ249583.1	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium	Chlorobi	93%	Sedimentos marinhos anaeróbicos
DHS 32	32	gij284157257 GQ261286.1 gij237966435 CU925601.1	Uncultured bacterium clone 1A3-16 Uncultured <i>Planctomycetes</i> bacterium	Firmicutes	99%	Sedimento de um lago
DHS 33	33	gij157287118 EU104342.1 gij106897076 DQ533685.1	Uncultured bacterium clone N1903_88 <i>Rubrobacteriales</i> bacterium Pa33	Não classificada	90%	Digestão anaeróbica de lodo
DHS 34	34	gij283979544 GU300233.1 gij166197412 AB376081.1	Uncultured <i>Microbacterium</i> sp. <i>Microbacterium</i> sp. YT0066	Não classificada	89%	Decantadores de lodos ativados
DHS 36	36, 44, 59, 62, 63, 64, 66	gij134021212 EF019788.1	Uncultured actinobacterium clone Elev_16S_974	Actinobacteria	98%	Oxidadora de ferro - acidofílica
DHS 38	38	gij281485355 AB538434.1	<i>Clostridium bifermentans</i>	Actinobacteria	88%	Amostras de solo
DHS 46	46	gij215414301 FM877589.1 gij237931340 CU927047.1 gij237997517 CU926454.1	<i>Clostridium</i> sp. AL04-10 Uncultured <i>Actinobacteria</i> bacterium Uncultured <i>Actinobacteria</i> bacterium	Actinobacteria	99%	Amostra ambiental
DHS 47	47	gij28207688 AY187622.1	<i>Clostridium tunisense</i>	Actinobacteria	92%	Amostras de solo
DHS 52	52	gij283776494 GU291517.1 gij258618085 GQ487748.1	Uncultured bacterium clone LaYa5a-66 Uncultured bacterium clone GB062005_1-13	Firmicutes	97%	Sistemas anaeróbios de tratamento de esgotos
DHS 57	57	gij89348117 DQ413163.1 gij253970975 GQ249583.1	<i>Rhodobacter</i> sp. EMB 174 Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium clone D41	Firmicutes	97%	Amostras de solo
DHS 61	61	gij45686225 AY490107.1 gij209360590 FJ234902.1 gij261262413 GQ898264.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. rops-5 Uncultured <i>Phyllobacteriaceae</i> bacterium clone S1-199 Uncultured bacterium clone L12-19	Actinobacteria	99%	Digestão anaeróbica de lodo
DHS 68	68	gij291331097 GU957629.1 gij148725034 AM690900.1	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium clone L12-19 Uncultured actinobacterium	Actinobacteria	99%	Digestão anaeróbica de lodo
DHS 72	72	gij254654059 FJ544445.1	<i>Mycobacterium</i> sp. S061	Firmicutes	96%	Sistemas anaeróbios de tratamento de esgotos
DHS 80	80	gij195424434 EU875565.1	Uncultured bacterium clone cg19	Firmicutes	97%	Amostras de água de um lago Amostras de água subterrânea e superficial

As *Actinobacteria* identificadas foram altamente similares a sequências depositadas no NCBI de isolados de amostras de solo, de digestores anaeróbios de lodo, de lagos e águas subterrâneas. Dois clones pertencentes ao filo *Actinobacteria* puderam ser identificados ao nível de gênero (*Mycobacterium* sp. e *Microbacterium* sp.) e um clone ao nível de ordem (*Rubrobacterales*). O restante dos clones não apresentou classificação, por ainda não serem cultivados. Vale ressaltar a detecção de *Mycobacterium* sp., gênero patogênico importante que apresenta as duas espécies causadoras da lepra e tuberculose.

Sete OTU agruparam nove clones identificados como *Firmicutes*. Destes, três foram classificados em nível de espécie como *Clostridium disporicum*, *C. bifermentans* e *C. tunisiensis*. As sequências relacionadas a estes clones (NCBI) foram isoladas de fezes humanas (*C. disporicum*) e de sistemas anaeróbios de tratamento de esgotos (*C. bifermentans* e *C. tunisiensis*).

Com a exceção de *Clostridium disporicum*, causadores de infecções hospitalares e bacteremias, estas bactérias possuem atividades metabólicas importantes para os processos de tratamento de esgotos. *C. bifermentans* é conhecida por realizar fermentação anaeróbica com concomitante produção de hidrogênio em lodos de sistemas de tratamento de esgotos (WANG *et al.*, 2003). *C. tunisiensis*, por sua vez, é uma bactéria redutora de enxofre formadora de esporos frequentemente encontrada em biofilmes de sistemas avançados de tratamento de esgotos (PARK *et al.*, 2001).

Este grupo de bactérias gram-positivas possui baixo índice de G+C e inclui bactérias formadoras de esporos importantes, como o gênero *Clostridium* encontrado neste trabalho (TORTORA, 2008). Por serem bactérias anaeróbias obrigatórias, a identificação destas bactérias no sistema DHS reforça a presença de microambientes anóxicos no biofilme deste material suporte.

Apenas duas OTU foram relacionadas ao filo *Proteobacteria*, que foi completamente representado pelas α – *Proteobacteria*. A espécie oxidadora de nitrito *Nitrobacter vulgaris* foi identificada com baixa porcentagem de similaridade com uma sequência depositada no NCBI. Os membros de *Rhodobacter* spp., α – *Proteobacteria* encontradas no sistema DHS, são conhecidos por possuírem muitas habilidades metabólicas. A capacidade deste gênero de desempenhar a fotoheterotrofia (utilizam luz como fonte de energia e um composto orgânico como fonte de carbono) o faz ser bem adaptado a todos os tipos de ecossistemas aquáticos (MADIGAN *et al.*, 2003).

Apenas um clone foi relacionado ao filo *Chlorobi*, tendo sido identificado em nível de gênero, com 93% de similaridade com a respectiva sequência depositada no NCBI. Este grupo filogenético inclui bactérias verdes sulfurosas, que oxidam sulfeto em condições anaeróbias, e produzem grânulos de enxofre.

A partir do alinhamento das amostras com outras sequências de mesma afiliação taxonômica, foi construída uma árvore filogenética aplicando o método de *Neighbor-Joining* e modelo *Maximum Composite Likelihood* no Programa Mega 4.1. Análise de Bootstrap com 1000 réplicas (Figura 5.23).

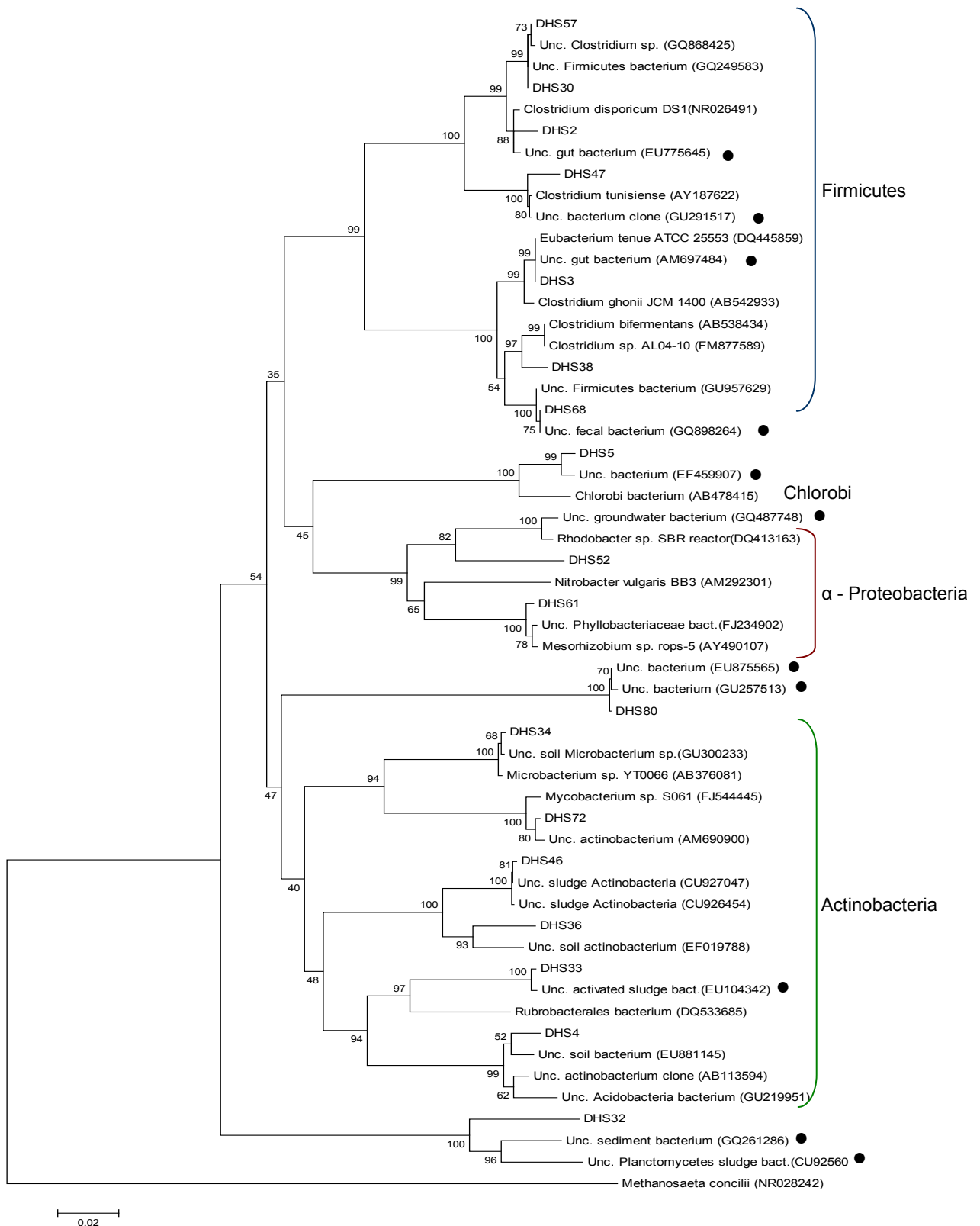


Figura 5.23. Árvore filogenética contendo seqüências (maiores que 700 nucleotídeos) do gene RNAr 16S da mistura de amostras de biofilme das três alturas do FBP preenchido por DHS (COV = 0,24 kgDBO/m³.d.), obtidas pela técnica PCR-clonagem. Análise de Bootstrap com 1000 réplicas. Barra = 2%. Marcação circular preta = bactérias não-classificadas.

Embora os clones encontrados tenham apresentado grande similaridade com algumas bactérias cultivadas, a maior parte deles foi relacionada a bactérias não cultivadas (62%). Isto significa que nestes casos a informação produzida pela análise molecular é relativa, não permite estabelecer uma identidade exata das sequências. Quando os microrganismos mais próximos não estão descritos é difícil, e às vezes impossível, deduzir o seu possível papel metabólico/funcional da sua posição filogenética (KÖCHLING, 2007).

Os resultados da técnica clonagem, quando comparados aos da DGGE (Tabela 5.3), foram mais consistentes e conclusivos. Na técnica DGGE apenas um grande grupo filogenético foi identificado com alta porcentagem de similaridade com uma bactéria não-cultivada (filo *Actinobacteria*), enquanto na clonagem quatro filós puderam ser classificados em nível de filós, classes, ordens, gêneros, e até mesmo espécies (*Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Chlorobi*).

6 CONCLUSÕES

- Grande diversidade de morfologias típicas de FBP foi verificada neste estudo. Microrganismos de diversas complexidades e funções foram visualizados, como microrganismos filamentosos, bactérias oxidadoras de sulfeto (*Beggiatoa* e *Thiothrix*), cocos, cianobactérias (*Anabaena* sp.), algas verdes e diatomáceas, espiroquetas, protozoários e nematódeos (*Diplogaster* sp.). O topo dos FBP apresentou a maior diversidade de morfologias, devido à maior disponibilidade de matéria orgânica, luz solar e oxigênio nesta altura. Esta análise propiciou a observação de predadores de bactérias, como *Diplogaster* spp., que podem ter sido responsáveis pela menor diversidade de *Bacteria* nesta porção dos reatores;
- As abundâncias relativas de *Bacteria*, AOB, NOB e *T. denitrificans* variaram significativamente ao longo das diferentes profundidades, para todos os materiais suporte testados. Estas variações foram atribuídas às diferentes condições ambientais propiciadas pelas diferentes profundidades, isto é, concentrações decrescentes de amônia e substratos orgânicos, concomitantes às crescentes concentrações de nitrito e nitrato;
- O aumento significativo da quantidade de células de *Nitrobacter* foi detectado do meio para o fundo de todos os FBP, em ambas as fases de operação (COV de 0,24 e de 0,38 kgDBO/m³.d), em consonância com as elevadas concentrações de nitrato e baixas concentrações de DBO também verificadas nesta porção dos filtros. Contudo, as abundâncias de células de AOB e *Nitrospira* permaneceram constantes;
- Os resultados dos testes ANOVA mostraram que diferentes materiais suporte abrigam ampla faixa de abundância microbiana. As diferentes composições e configurações dos materiais suporte proporcionam condições ambientais distintas, conduzindo ao desenvolvimento de vários perfis diferentes de distribuição e abundâncias de *Bacteria*, AOB e NOB e *T. denitrificans*. O FBP preenchido por DHS apresentou a maior abundância de todos os microrganismos investigados nas duas fases de operação. Os espaços intersticiais do DHS são ideais para a retenção da biomassa e também dos substratos disponíveis, resultando em condições ambientais muito favoráveis para a nitrificação;

- As contagens de *Bacteria* foram significativamente maiores na COV mais elevada (0,38 kgDBO/m³.d). A premissa de que COV mais elevadas proporcionam níveis mais altos de bactérias heterotróficas, comparadas às nitrificantes, foi desta forma confirmada. O aumento da COV promove, ainda, o maior espessamento do biofilme e, conseqüentemente, o aparecimento de microambientes anóxicos e anaeróbios. Estas condições ambientais foram determinantes para o desenvolvimento de *Thiobacillus denitrificans* nos materiais suporte DHS e aparas de conduíte, mas apenas na fase operacional com COV mais elevada;
- O aumento da COV, de 0,24 para 0,38 kgDBO/m³.d, também resultou em um decréscimo significativo da quantidade de nitrificantes em todos os FBP. Isto ocorreu possivelmente devido ao crescimento excessivo e predomínio de bactérias heterotróficas sobre as nitrificantes. Tais aspectos estão de acordo com a baixa remoção de amônia observada na fase operacional com COV mais elevada;
- Os biofilmes formados nos FBP estudados apresentaram diversidades de espécies distintas. Apesar de os reatores terem sido alimentados pelo mesmo efluente do reator UASB, durante as duas fases operacionais, as diferentes composições e configurações dos materiais de enchimento resultaram no desenvolvimento de diferentes condições ambientais, que favoreceram o estabelecimento diversificado de espécies;
- Os resultados obtidos pela técnica clonagem foram mais robustos que os encontrados para a DGGE. *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Chlorobi* foram identificadas até mesmo em nível de espécie em amostras de biofilme com mais de 97% de similaridade com seqüências depositadas no NCBI provenientes de sistemas de tratamento de esgoto doméstico aeróbio/anaeróbio;
- A utilização das metodologias quantitativa e qualitativa (FISH, DGGE e clonagem) permitiu o intenso e apurado estudo das complexas populações microbianas e suas diversidades genéticas em biofilmes de FBP pós-UASB. A correlação entre os resultados de abundância relativa, quantidade de células, diversidade e concentrações de DBO, amônia, nitrito e nitrato proporcionou o melhor conhecimento dos processos biológicos envolvidos na nitrificação, e também de como as comunidades microbianas variam e se adaptam às condições adversas às quais os reatores são freqüentemente submetidos nas estações de tratamento de esgoto.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A forte correlação entre o aumento da COV e as abundâncias de bactérias heterotróficas e nitrificantes verificada nos FBP estudados neste trabalho demonstrou que a atividade das bactérias nitrificantes é fortemente influenciada pelas mudanças de carga. Estes eventos resultam, por exemplo, das mudanças das concentrações de matéria orgânica e nutrientes que ocorrem sazonalmente nas águas residuárias. Considerando os estudos de Tandukar *et al.* (2007), os sistemas UASB-FBP são uma boa alternativa para o tratamento de esgoto doméstico, sendo que algumas melhorias para aumentar a eficiência de nitrificação são ainda necessárias.

Algumas estratégias para o aperfeiçoamento de FBP pós reator UASB incluem aumentar a altura do compartimento reacional e aplicar uma COV abaixo de 0,25 kgDBO/m³.dia em reatores pouco profundos (abaixo de 2,5 m), quando a remoção de amônia é um dos objetivos do processo. A pequena altura dos FBP estudados neste trabalho pode ter dificultado a colonização do biofilme pelas nitrificantes na COV mais elevada, devido à dominância das bactérias heterotróficas (MISSAGIA *et al.* 2008), mesmo nas partes mais baixas das unidades, sugerindo que FBP mais altos que os utilizados podem ser mais adequados para o equilíbrio das comunidades de nitrificantes e heterotróficas, e assim assegurar a estabilidade e confiabilidade dos reatores.

A utilização de esponjas de poliuretano é considerada uma importante estratégia para reduzir o tamanho dos compartimentos e contribuir para o aumento da eficiência de nitrificação em FBP. Almeida *et al.* (2009) investigaram o processo de nitrificação em colunas altas preenchidas com esponjas, de forma a criar um ambiente adequado para o desenvolvimento de nitrificantes. Estas esponjas possuem mais de 90% de espaços vazios, resultando no aumento significativo da retenção da biomassa nos interstícios, e, deste modo, maiores tempos de retenção de sólidos neste sistema. Ademais, a produção de lodo excedente pelo DHS é desprezível, pois os longos tempos de retenção de sólidos proporcionam um intervalo mais amplo para a autólise do lodo pelo próprio sistema. Resultados obtidos da utilização do DHS demonstram que este processo exibe substancial tolerância contra choques de até o dobro da carga hidráulica aplicada e de quatro vezes a COV (TANDUKAR *et al.*, 2007).

8 REFERÊNCIAS

- AHN, Y. O. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, 41:1709-1721, 2006.
- ALMEIDA, P. G. S. Efeito de diferentes tipos de meio suporte no desempenho de filtros biológicos percoladores aplicados ao pós-tratamento de efluentes de reatores UASB, com ênfase na nitrificação. *Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos – Escola de Engenharia - UFMG*. 2007.
- ALMEIDA, P. G. S.; CHERNICHARO, C. A. L.; SOUZA, C. L. Development of compact UASB/trickling filter systems for the treatment of domestic wastewater in small communities in Brazil. *Water Science and Technology*, (59):1431-1439, 2009.
- AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172: 762-770, 1990.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59:143–169, 1995.
- ARAKI, N.; OHASHI, A.; MACHDAR, I.; HARADA, H. Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponge-cubes as attachment site. *Water Science and Technology*, 39:23-31, 1999.
- BIESTERFELD, S., FIGUEROA, L., HERNANDEZ, M., RUSSELL, P. Quantification of nitrifying bacterial populations in a full-scale nitrifying trickling filter using fluorescent *in situ* hybridization. *Water Environmental Research*, 73: 329-338, 2001.
- BOON, N.; DE WINDT, W.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 39:101-112, 2002.
- CHERNICHARO, C. A. L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Vol. 5 – Reatores anaeróbios, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG, 2ª. edição, 380 p. 2007.
- DAIMS, H.; NIELSEN, P. H.; NIELSEN, J. L.; JURETSCHKO, S., WAGNER, M. Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and *in situ* physiology. *Water Science and Technology*, 41:85–90, 2000.
- DAIMS, H.; NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H.; SCHLEIFER, K.-H.; WAGNER, M. *In situ* characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:5273–5284, 2001.
- de BIE, M. J. M.; SPEKSNIJDER, A. G. C. L.; KOWALCHUK, G. A.; SCHURMAN, T.; ZWART, G.;STEPHEN, J. R.; DIEKMANN, O. E.; LAANBROEK, H. J. Shifts in the dominant populations of ammonia-oxidizing beta-subclass *Proteobacteria* along the eutrophic Schelde estuary. *Aquatic Microbiol Ecology*, 23:225–236, 2001.
- DIEZ, B.; PEDRÓS-ALIÓ, C; MARCH, T. L.; MASSANA, R. Application of denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukariotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:2942-2951, 2001.
- DIONISI, H. M.; LAYTON, A. C.; HARMS, G.; GREGORY, I. R.; ROBINSON, K. G.; SAYLER, G. S. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria

- and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:245–253, 2002.
- ELENER, D., MILFERSTEDT, K., ZHANG, W., HAUSNER, M., MORGENROTH, E. Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm. *Water Research*, 41: 4657-4671, 2007.
- EPA. Process design manual of nitrogen control. EPA 625/r-93/010, Cincinnati, Ohio. 1993.
- FERNÁNDEZ, N.; GÓMEZ, R.; AMILS, R.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD, J. A.; SANZ, J. L. Microbiological and structural aspects of granular sludge from autotrophic denitrifying reactors. *Water Science and Technology*, 54:11-17, 2006.
- FIGUEROA, L.; SILVERSTEIN, J. The effect of particulate organic matter on biofilm nitrification. *Water Environment Research*, 64:728, 1992.
- FINKELSTEIN, J. E.; FRANCOMANO, C. A.; BRUSILOW, S. W.; TRAYSTMAN, M. D. Use of denaturing gradient gel electrophoresis for detection of mutation and prospective diagnosis in late onset ornithine transcarbamylase deficiency. *Genomics*, 7:167-172, 1990.
- FISCHER, S. G. e LERMAN, L. S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, 16:191-200, 1979.
- FUX, C.; BOEHLER, M.; HUBER, P.; BRUNNER, I.; SIEGRIST, H. R. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. *Journal of Biotechnology*, 99:295–306, 2002.
- GILPIN, M.; GRAHAM, A. E. G.; WOODRUFF, D. S. Ecological dynamic and agricultural landscapes. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 42:27-52, 1992.
- GONÇALVES, R. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; ANDRADE NETO, C.O.; ALEM SOBRINHO P.; KATO, M. T.; COSTA, R. H. R.; AISSE, M. M.; ZAIAT, M. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores com biofilme. Cap. 4. In: Chernicharo, C.A.L. (coordenador). *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios*. FINEP/PROSAB, Rio de Janeiro, Brasil, 544 p., 2001.
- GÓRSKA, J.S.; CICHON, A.; MIKSCH, K. Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification. *Water Science and Technology*, 36:73-78, 1997.
- GRADY, C.P.L.J.; LIM, H.C. *Biological Wastewater Treatment: Theory and Applications*. New York: Marcel Dekker Inc, p.964, 1980.
- HAO, X. D.; HEIJNEN, J. J.; van LOOSDRECHT, M. C. M. Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechnology and Bioengineering*, 77:266–277, 2002.
- HELMER-MADHOK, C.; SCHMID, M.; FILIPOV, E.; GAUL, T.; HIPPEN, A.; ROSENWINKEL, K. H.; SEYFRIED, C. F.; WAGNER, M.; KUNST, S. Deammonification in biofilm systems: population structure and function. *Water Science and Technology*, 46:223–231, 2002.
- HELMER, C.; KUNST, S.; JURETSCHKO, S.; SCHMID, M. C.; SCHLEIFER, K.-H.; WAGNER, M. Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. *Water Science and Technology*, 39:13-21, 1999.
- HENEGARIU, O. PCR and multiplex PCR: guide and troubleshooting <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html>. Acessado em 26/03/2009. 1997.

- HIGGINS, I. J.; BURNS, R. G. The Chemistry and Microbiology of pollution. Academic Press, London, 1975.
- HOVANEC, T. A. e DELONG, E. F. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:2888–2896, 1996.
- JAMES, A. The bacteriology of trickling filters. *Journal of Applied Bacteriology*, 2:107-207, 1964.
- JAMES, F.C. & RATHBURN, S. Rarefaction, relative abundance, and diversity of avian communities. *Auk*, 98:785-800, 1981.
- JETTEN, M. S. M.; SCHMID, M. A.; SCHMIDT, I.; WUBBEN, M.; van DONGEN, U.; ABMA, W.; SLIEKERS, A. O.; REVSBECH, N. P.; BEAUMONT, H. J. E.; OTTOSEN, L.; VOLCKE, E.; LAANBROEK, H. J.; CAMPOS-GÓMEZ, J. L.; COLE, J. A.; van LOOSDRECHT, M. C. M.; MULDER, J. W.; FUERST, J.; RICHARDSON, D.; van de PAS-SCHOONEN, K. T.; MENDEZ-PAMPÍN, R.; THIRD, K.; CIRPUS, I. Y.; van SPANNIN, R.; BOLLMANN, A.; NIELSEN, L. P.; OP DEN CAMP, H. J. M.; SCHULTZ, C.; GUNDERSEN, J.; VANROLLEGHEM, P.; STROUS, M.; WAGNER, M.; KUENE, J. G. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1:51–63, 2002.
- JETTEN, M. S. M.; WAGNER, M.; FUERST, J.; VAN LOOSDRECHT, M.; KUENEN, G.; STROUS, M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (*anammox*) process. *Current opinion in Biotechnology*, 12:283-288, 2001.
- JURETSCHKO, S.; TIMMERMANN, G.; SCHMID, M.; SCHLEIFER, K.-H.; POMMERENING-RÖSER, A.; KOOPS, H.-P.; WAGNER, M. Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:3042–3051, 1998.
- KEMPTON, R.A. The structure of species abundance and measurement of diversity. *Biometrics*, 35:307-321, 1979.
- KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 170:75-86, 1995.
- KIRSTEN, K.; BOCK, E. Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* nitrate reductases. *Arch. Microbiol.* 160:447–453. 1993.
- KÖCHLING, T. Biodiversidad microbiana de sedimentos marinos y su papel en la degradación anaerobia de los sulfonatos de alquilbenceno leneales. *Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Biología Molecular da Universidad Autónoma de Madrid*. Madrid, 2007.
- KOH, Y. K. K., CHIU, T. Y., BOOBIS, A., CARTMELL, E., SCRIMSHAW, M. D., LESTER, J. N. The influence of operating parameters on the biodegradation of endocrine disrupting chemicals during wastewater treatment processes. *Environmental Science & Technology*, 2008.
- KOOPS, H.-P. & POMMERENING-RÖSER, A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 37:1–9, 2001.
- KOWALCHUK, G. A.; STEPHEN, J. R.; DE BOER, W.; PROSSER, J. I.; EMBLEY, T. M.; WOLDENDORP, J. W. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β Subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and

- sequencing of PCR-amplified 16S Ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1489-1497, 1997.
- KUENEN, J. G. e ROBERTSON, L. A. Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiology Reviews*, 15:109-117, 1994.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp.115-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. London: Willey. 1991.
- LEE, N.M.; WELANDER, T. Influence of predators on nitrification in aerobic biofilms processes. *Water Science and Technology*, 29:355-363, 1994.
- LESSARD, P.; BIHAN, Y. Fixed film processes. *In: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, pp.326. Edited by Duncan Mara & Nigel Horan. London: Elsevier. 2003.
- LYAUTEY, E.; TEISSIER, S.; CHARCOSSET, J-Y.; ROLS, J-L.; GARABÉTIAN, F. Bacterial diversity of epilithic biofilm assemblages of an anthropised river section, assessed by DGGE analysis of a 16S rDNA fragment. *Aquatic microbial ecology*, 33:217-224, 2003.
- LYDMARK, P.; LIND, M.; SORENSSON, F.; HERMANSSON, M. Vertical distribution of nitrifying populations in bacterial biofilms from a full-scale nitrifying trickling filter. *Environmental Microbiology*, 8(11), 2036-2049, 2006.
- MACHDAR, I.; SEKIGUCHI, Y.; SUMINO, H; HARADA, H. a novel and cost-effective sewage treatment system consisting of UASB pre-treatment and aerobic port-treatment units for developing countries. *Water Science and Technology*, 36:189-197, 1997.
- MAGURRAN, A.E. Ecological diversity and its measurement. MAGURRAN, A. E., eds. p. 177, 1988.
- MAHAFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microbial Ecology*, 34:210-223, 1997.
- MAYER, C.; MORITZ, R.; KIRSCHNER, C.; BORCHARD, W.; MAIBAUM, R.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H.-C. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26:3-16, 1999.
- MENDOZA-ESPINOSA, L.; STEPHENSON, T. A review of biological aerated filters (BAFs) for wastewater treatment. *Environmental Engineering Science*, 16: 201–216, 1999.
- METCALF; EDDY. *Wastewater engineering: treatment, and reuse*. New York: Metcalf & Eddy, Inc., 4 th. Ed., 1819p., 2003.
- MISSAGIA, B. S.; ALMEIDA, P. G. S.; SILVA, S. Q.; SANZ, J. L.; CHERNICHARO, C. A. L. Nitrification in trickling filters applied to the post-treatment of effluents from UASB reactor: correlation between ammonia removal and the relative abundance of nitrifying bacteria. *Proc. The Third International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering (3IMEBE)*. Palma de Mallorca, Spain, 2008.
- MOBARRY, B. K.; WAGNER, M.; URBAIN, V.; RITTMAN, B. E.; STAHL, D. A. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2156-2162, 1996.
- MULDER, A.; van de GRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16:177–83. 1995.

- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73:127-141, 1998.
- MUYZER, G., DE WAAL, E. C., UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:695-700, 1993.
- NICOLAISEN, M. H.; RAMSING, N. B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DDGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 50:189-203, 2002.
- ODUM, E. P. Populações em comunidades. In: ODUM, E. P., eds, *Ecologia*. São Paulo: Guanabara, 258-272, 1988.
- OKABE, S.; HIRATA, K.; WATANABE, Y. Dynamic changes in spatial microbial distribution in mixed-population biofilms: experimental results and model simulation. *Water Science and Technology*, 32 (8), 67-74, 1995.
- OKABE, S.; HIRATA, K.; OZAWA, Y.; WATANABE, Y. Spatial microbial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed population biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 50:24-35, 1996.
- OKABE, S.; SATOH, H.; WATANABE, Y. *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3182-3191, 1999.
- OVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, 36:303-315, 1998.
- PERRY, A.D.M.; AMARANTHUS, M.P.; BORCHERS, J.G.; BORCHERS, S.L.; BRAINERD, R.E. Bootstrapping in ecosystem. *Bioscience*, 39:230-237, 1989.
- PERSSON, F.; WIK, T.; SÖRENSON, F.; HERMANSSON, M. Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter. *Water Research*, 36:1439-1448, 2002.
- PROSSER, J. I. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 30:125-181, 1989.
- PURKHOLD, U.; POMMERENING-RÖSER, A.; JURETSCHKO, S.; SCHMID, M. C.; KOOPS, H.-P.; WAGNER, M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:5368-5382, 2000.
- RASKIN, L.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. A. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:3847-3857, 1996.
- RITTMANN, B. E.; STILWELL, D.; OHASHI, A. The transient-state, multiple-species biofilm model for biofiltration processes. *Water Research*, 36:2342-2356, 2002.
- ROBERTSON, L. A. e KUENEN, G. J. The genus *Thiobacillus*. *Prokaryotes*, 5:812-827, 2006.
- ROSADO, A. S.; DUARTE, G. Utilização de Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes (DGGE) e Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE) para estudar a diversidade Microbiana, In: MELLO, I. (Ed.) *Genética e Melhoramento de Microrganismos*, p. 97-128, 2002.

- ROTTTHAUWE, J. H.; WITZEL, K. P.; LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:4704–4712, 1997.
- ROWAN, A. K.; SNAPE, J. R.; FEARNSIDE, D.; BARER, M. R.; CURTIS, T. P.; HEAD, I. A. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, 43:195-206, 2003.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230(4732):1350-1354, 1985.
- SANZ, J. L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry*, (42):119-133, 2007.
- SARNER, E.; MARKUND, S. Influence of particulate organics on the removal of dissolved organics in fixed-film biological reactors. *Water Science and Technology*, 17, 1984.
- SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; HOMMES, N. G.; ARP, D. J. Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*, 176:504–510, 1994
- SCHMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M.; STROUS, M.; JURETSCHKO, S.; JETTEN, M. S. M.; METZGER, J.; SCHLEIFER, K. H.; WAGNER, M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology*, 23:93–106, 2000.
- SCHRAMM, A.; deBEER, D.; van den HEUVEL, J. C.; OTTENGRAF, S.; AMANN, R. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3690–3696, 1999.
- SCHRAMM, A.; LARSEN, L. H.; REVSBECH, N. P.; RAMSING, N. B.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K-H. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* Hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:4641-4647, 1996.
- SHANNON, C.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication, Vol 3. Urbana University of Illinois Press, Chicago, 1963.
- SLIEKERS, A. O.; DERWORT, N.; CAMPOS GOMES, J. L.; STROUS, M.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Research*, 36:2475-2482, 2002.
- STEWART, P. S.; MURGA, R.; SRINIVASAN, R.; DE BEERS, D. Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water Research*, 29:2006-2009, 1995.
- SUTHERLAND, I. W. Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology*, 43:77-83, 2001.
- TANDUKAR, M., OHASHI, A., HARADA, H. Performance comparison of a pilot-scale UASB and DHS system and activated sludge process for the treatment of municipal wastewater. *Water Research*, 41: 2697-2705, 2007.
- TESKE, A.; ALM, E.; REGAN, J. M.; TOZE, S.; RITTMANN, B. E.; STAHL, D. A. Evolutionary relationships among ammonia-and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 176:6623–6630, 1994.

- THORN, M.; MATTSSON, A.; SÖRENSSON, F. Biofilm development in a nitrifying trickling filter. *Water Science and Technology*, 34:83–89, 1996.
- VANDEVIVERE, P. e KIRCHMAN, D. L. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a *Bacterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:3280-3286, 1993.
- VAZOLLER, R. F.; MARTINS, M. T.; DUBOURGUIER, H. C. *In: Ecologia da digestão anaeróbia: curso*. São Paulo; CETESB, 163p, 1988.
- VERSTRAETE, W. e PHILIPS, S. Nitrification-denitrification processes and technologies in view contexts. *Environmental pollution*, 102:717-726, 1998.
- WAGNER, M.; RATH, G.; AMANN, R.; KOOPS, H. P.; SCHLEIFER, K. H. In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 18:251-264, 1995.
- WALLNER G.; AMANN, R.; BEISKER, W. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14:136–143, 1993.
- WATANABE, K.; WATANABE, K.; KODAMA, Y.; SYUTSUBO, K.; HARAYAMA, S. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4803-4809, 2000.
- WHITTAKER, R.H. Dominance and diversity in land plant communities. *Science*, 147:250-260, 1965.
- WILHM, J. Graphic and mathematical analyses of biotic communities in polluted streams. *Annual Review of Entomology*, 17:223-252, 1972.
- WIJEYEKOON, S.; MINO, T.; SATOH, H.; MATSUO, T. Effects of substrate loading rate on biofilm structure, *Water Research*, 38:2479-2488, 2004.
- WIK, T. Trickling filters and biofilm reactor modelling. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2:193–212, 2003.
- WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:661-671, 2000.
- WOESE, C. & FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5088-5090, 1977.
- ZHANG, T. C. & LAMPE, D. G. Sulfur: Limestone autotrophic denitrification process for treatment of nitrate-contaminated water: batch experiments. *Water Research*, 33:599-608, 1999.
- ZUMFT, W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 61:533-536, 1997.

Anexo I: Análise *General linear models* (GLM): efeito de diferentes tipos de materiais suporte, profundidades, COV (fases de operação) e suas interações fatoriais na média do número relativo de células marcadas [all log₁₀ (x + 1) transformed] para cada sonda específica. Os valores significativos de P estão em negrito.

Sonda	Efeito	d.f. ^a	S.S. ^b	F ^c	P
DAPI	Material suporte	3	14,77	553,00	<,0001
	Fase de operação	1	1,05	117,58	<,0001
	Profundidade	2	1,39	77,91	<,0001
	Material suporte x profundidade	6	7,08	132,45	<,0001
	Material suporte x fase	3	10,90	407,96	<,0001
	Profundidades x fases	2	1,12	63,12	<,0001
	Material suporte x profundidade x fase	6	11,27	210,92	<,0001
EUB338	Material suporte	3	12,36	74,10	<,0001
	Fase de operação	1	1,42	25,61	<,0001
	Profundidade	2	1,89	17,01	<,0001
	Material suporte x profundidade	3	7,35	44,05	<,0001
	Material suporte x fase	6	7,83	23,49	<,0001
	Profundidades x fases	2	0,55	4,97	0,0077
	Material suporte x profundidade x fase	6	11,71	35,09	<,0001
NIT3	Material suporte	3	1,17	2,96	0,0332
	Fase de operação	1	3,18	24,04	<,0001
	Profundidade	2	1,46	5,53	0,0045
	Material suporte x profundidade	3	1,09	2,74	0,0444
	Material suporte x fase	6	0,82	1,03	0,4061
	Profundidades x fases	2	6,72	25,42	<,0001
	Material suporte x profundidade x fase	6	2,46	3,11	0,0061
Nso1225	Material suporte	3	0,47	1,34	0,2622
	Fase de operação	1	32,29	277,51	<,0001
	Profundidade	2	0,82	3,51	0,0317
	Material suporte x profundidade	3	8,65	24,79	<,0001
	Material suporte x fase	6	6,47	9,26	<,0001
	Profundidades x fases	2	2,14	9,19	<,0001
	Material suporte x profundidade x fase	6	7,45	10,67	<,0001
Nso190	Material suporte	3	8,06	25,88	<,0001
	Fase de operação	1	1,92	18,54	<,0001
	Profundidade	2	0,01	0,05	0,9479
	Material suporte x profundidade	3	3,10	9,95	<,0001
	Material suporte x fase	6	1,35	2,16	0,0479
	Profundidades x fases	2	0,53	2,57	0,0787
	Material suporte x profundidade x fase	6	2,64	4,23	0,0005
Ntspa662	Material suporte	3	6,43	14,42	<,0001
	Fase de operação	1	1,61	10,81	0,0012
	Profundidade	2	4,03	13,54	<,0001
	Material suporte x profundidade	3	4,93	11,05	<,0001
	Material suporte x fase	6	9,41	10,54	<,0001
	Profundidades x fases	2	6,46	21,73	<,0001
	Material suporte x profundidade x fase	6	8,01	8,98	<,0001
TDB121	Material suporte	3	7,86	46,76	<,0001
	Fase de operação	1	7,61	135,84	<,0001
	Profundidade	2	1,07	9,57	0,0001
	Material suporte x profundidade	3	7,86	46,76	<,0001
	Material suporte x fase	6	5,00	14,87	<,0001
	Profundidades x fases	2	1,07	9,57	0,0001
	Material suporte x profundidade x fase	6	5,00	14,87	<,0001

^a Grau de liberdade

^b Soma dos quadrados

^c Parâmetro F de Fisher