

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

CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA E
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FENOL EM UM
REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL COM
ATIVIDADE ANAMMOX

Alyne Duarte Pereira

Belo Horizonte
2013

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA E AVALIAÇÃO DO
EFEITO DO FENOL EM UM REATOR EM BATELADA
SEQUENCIAL COM ATIVIDADE ANAMMOX**

Alyne Duarte Pereira

Alyne Duarte Pereira

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA E AVALIAÇÃO DO
EFEITO DO FENOL EM UM REATOR EM BATELADA
SEQUENCIAL COM ATIVIDADE ANAMMOX**

Dissertação 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 Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de águas residuárias

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG

2013

Página com as assinaturas dos membros da banca examinadora, fornecida pelo Colegiado do Programa

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Juliana Calábria de Araújo, pela orientação durante todo o trabalho, pelas oportunidades oferecidas que foram imprescindíveis para meu crescimento pessoal e profissional. Pela confiança depositada em mim, pelo respeito, atenção e disponibilidade para me ajudar em todos os momentos que se fizeram necessários.

À Cíntia Leal, pelo interesse e empenho em me auxiliar durante a execução do projeto, e acima de tudo pela amizade construída durante estes dois anos de convívio.

À Marcela Dias, pela essencial ajuda no cultivo das bactérias anammox, nas análises físico-químicas e nos experimentos de biologia molecular.

Aos bolsistas de iniciação científica do projeto anammox, Guilherme Brugger e Isabella Mancuelo, que tanto me auxiliaram durante a execução do experimento.

À Érika Mac Conell, por sua paciência e disposição em me ajudar nas análises de biologia molecular, pelas experiências compartilhadas, as quais contribuíram imensamente para a realização deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia: Renata Côrtes, Graziela Garcia, Luciene Alves, Victor Franco, Cristina Costa, Karoline Lopes, Ana Maria, Luciana Carvalho e a todos já citados anteriormente, pela excelente convivência e por tornarem as longas horas de trabalho mais agradáveis e divertidas.

Ao Cassiano e aos estagiários do Laboratório de Análises Instrumentais, pela realização das análises de nitrato.

À Ana Paula Campos, por compartilhar suas experiências adquiridas durante o experimento de enriquecimento e cultivo de bactérias anammox, desenvolvido em seu mestrado.

À professora Claudia Etchebehere Arenas que possibilitou as análises por pirosequenciamento das amostras coletadas neste estudo.

À Patrícia e Mariana, do Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG por terem possibilitado e colaborado com a análise dos perfis de DGGE por meio do *Software* BioNumerics.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da UFMG pelos ensinamentos transmitidos nas disciplinas ministradas durante o curso.

À Lívia Lana e Raissa Vitareli, grandes companheiras durante o mestrado e amigas para toda a vida.

Aos meus pais, José Lucas e Maria Leonor, exemplos de vida e dedicação. Obrigada por serem sempre meus maiores incentivadores, pelo apoio, carinho e amor incondicionais.

Ao meu irmão, Rangel, pelo carinho, torcida e amizade.

Ao meu noivo, Gustavo, sempre presente em todos os momentos, pelo amor, paciência, por me motivar e inspirar, e também pelas importantes contribuições feitas a esse trabalho.

A todos os familiares e amigos que torceram por mim e compreenderam minha ausência durante estes dois anos de intenso trabalho.

À Vanessa e Anna Gabriela, companheiras de república, pelo apoio e amizade.

À COPASA pelo fornecimento do lodo de inóculo para a partida do reator anammox.

À FAPEMIG, pela bolsa de mestrado concedida, a qual possibilitou minha dedicação exclusiva ao trabalho desenvolvido.

Ao CNPq, FINEP e FAPEMIG pelo apoio financeiro essencial para a execução do trabalho.

À Deus pelas grandes oportunidades que coloca em minha vida e por me dar forças para prosseguir em todos os momentos.

RESUMO

O processo de oxidação anaeróbia da amônia (anammox) vem sendo estudado para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes, por seus atrativos econômicos e sustentabilidade ambiental. O estudo do efeito de compostos tóxicos, como os fenóis, sobre a atividade das bactérias responsáveis pela conversão da amônia é importante, uma vez que esse composto está presente em muitos despejos industriais ricos em nitrogênio amoniacal. Os objetivos deste trabalho foram enriquecer bactérias anammox a partir de lodo ativado, caracterizar microbiologicamente a biomassa cultivada e avaliar o efeito de concentrações crescentes de fenol sobre o processo anammox. O enriquecimento foi realizado em um reator em batelada sequencial (RBS) de 2L, alimentado com meio mineral autotrófico, mantido à temperatura de 35 °C e pH próximo a 7,5. As concentrações afluentes de N-NH_4^+ e N-NO_2^- foram inicialmente iguais a 20 mg.L^{-1} e alcançaram valores de 177 e 160 mg.L^{-1} , respectivamente. Fenol foi adicionado ao reator do 335º ao 377º dia de operação com concentrações afluentes variando de 10 mg.L^{-1} até 300 mg.L^{-1} . Atividade anammox foi detectada após 90 dias de operação do RBS e após esta fase as eficiências médias de remoção de N-NH_4^+ e N-NO_2^- foram próximas a 75% e 90%, respectivamente. A carga máxima de nitrogênio removida foi igual a 390 $\text{g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Perdas de eficiências iguais a 48% de amônia e 15% de nitrito foram observadas, quando as concentrações de fenol atingiram 300 mg.L^{-1} , em comparação com período precedente à alimentação do reator com fenol. Bactérias anammox foram detectadas pela PCR em todas as amostras de biomassa coletadas ao longo do tempo. A análise de FISH (utilizando a sonda Amx820) confirmou a presença de células com morfologias características de bactérias anammox. Pela técnica de PCR em tempo real, foram obtidas concentrações máximas de RNAr 16S de bactérias anammox iguais a $4,7 \times 10^{10}$ cópias. g^{-1} de lodo. Os perfis da comunidade microbiana pela PCR-DGGE revelaram a predominância de uma banda em todos os tempos analisados, cuja sequência apresentou 99% de identidade com aquela de *Candidatus* “Brocadia sp. 40”. O pirosequenciamento da amostra coletada aos 270 dias de operação demonstrou que 12,16% das sequências obtidas foram estreitamente relacionadas ao gênero *Candidatus* “Brocadia”. Portanto, o enriquecimento de bactérias anammox foi realizado com sucesso, o que foi confirmado pelos resultados físico-químicos e pela caracterização microbiológica. O reator foi capaz de tolerar concentrações elevadas de fenol (200 mg.L^{-1}) sem que houvesse inibição do processo anammox, sugerindo que o mesmo pode ser aplicado no tratamento de despejos com esse tipo de composto em sua constituição.

ABSTRACT

The anaerobic ammonia oxidation (anammox) process has been studied for biological nitrogen removal due to its economic attractive and environmental sustainability. The study of the effect of toxic compounds such as phenols, on the anammox activity is important, since this compound is present in many industrial wastewaters rich in ammonia. The aims of the study were to enrich anammox bacteria from activated sludge, to characterize microbial community and to evaluate the effect of increasing concentrations of phenol on the anammox process. A sequential batch reactor (SBR) of 2L was used for anammox enrichment, fed with autotrophic mineral medium at 35 ° C and pH around 7.5. The initial concentrations of NH_4^+ -N and NO_2^- -N were 20 mg.L^{-1} , reaching 177 and 160 mg.L^{-1} , respectively. Phenol was added to the reactor from the 335th day till 370th day with influent concentrations ranging from 10 to 300 mg.L^{-1} . Anammox activity was detected after 90 days of RBS operation and after this phase the average ammonium and nitrite removal efficiencies were near 75% and 90%, respectively. The maximum nitrogen removal rate was equal to 390 $\text{g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Losses of ammonium and nitrite removal efficiencies of 57% and 15% in RBS were observed when phenol concentrations were nearly to 300 mg.L^{-1} . Anammox bacteria was detected by PCR in all biomass samples collected. FISH analysis (with Amx820 probe) confirmed the presence of cells with the typical morphology of anammox bacteria. By the real time PCR, concentrations of 16S rRNA anammox equal to 4.7×10^{10} copies.g⁻¹ sludge were obtained. The microbial community profiles revealed by PCR-DGGE showed a band that prevailed during all the experiment and had 99% of sequence identity to *Candidatus* "Brocadia sp. 40". The pyrosequencing results from sample collected at 270 days showed that 12.16% of the sequences retrieved closely related to *Candidatus* "Brocadia". Thus, the enrichment of anammox bacteria was successfully performed which was supported by the physical-chemical results and the microbiological characterization. The reactor was able to tolerate high concentrations of phenol (200 mg.L^{-1}) without any anammox inhibition, suggesting that these process can be applied to the treatment of wastewaters containing phenol.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 CICLO DO NITROGÊNIO	5
3.1.1 <i>Nitrificação.....</i>	<i>6</i>
3.1.2 <i>Desnitrificação</i>	<i>7</i>
3.1.3 <i>Oxidação anaeróbia da amônia</i>	<i>9</i>
3.1.4 <i>Redução desassimilatória do nitrato.....</i>	<i>9</i>
3.1.5 <i>Redução assimilatória do nitrato</i>	<i>9</i>
3.1.6 <i>Assimilação da amônia.....</i>	<i>10</i>
3.1.7 <i>Fixação biológica de nitrogênio.....</i>	<i>10</i>
3.1.8 <i>Novos processos envolvidos no ciclo do nitrogênio.....</i>	<i>11</i>
3.2 PROCESSO ANAMMOX (ANAEROBIC AMMONIUM OXIDATION).....	12
3.3 APLICAÇÃO DO PROCESSO ANAMMOX PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIAL DE EFLUENTES	18
3.4 COMPOSTOS QUE EXERCEM EFEITO TÓXICO SOBRE A ATIVIDADE ANAMMOX.....	27
3.5 INIBIÇÃO DO PROCESSO ANAMMOX POR FENÓIS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 OPERAÇÃO DO REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL (RBS)	36
4.1.1 <i>Características e modo de operação do RBS</i>	<i>36</i>
4.1.2 <i>Inóculo.....</i>	<i>38</i>
4.1.3 <i>Meio de cultura utilizado no enriquecimento de bactérias anammox.....</i>	<i>39</i>
4.1.4 <i>Avaliação do efeito de concentrações crescentes de fenol no processo anammox</i>	<i>41</i>
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	42

4.2.1	<i>Análise de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) no lodo de inóculo</i>	42
4.2.2	<i>Determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺)</i>	42
4.2.3	<i>Determinação da concentração de nitrogênio na forma de nitrito (N-NO₂⁻)</i>	43
4.2.4	<i>Determinação das concentrações de nitrato (NO₃⁻)</i>	44
4.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	45
4.3.1	<i>Extração de DNA</i>	47
4.3.2	<i>Detecção de bactérias anammox pela PCR</i>	48
4.3.3	<i>Detecção de bactérias anammox pela técnica de FISH</i>	50
4.3.4	<i>Análise do perfil da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE</i>	51
4.3.5	<i>Quantificação de bactérias anammox por meio de PCR em tempo real</i>	53
4.3.5.1	<i>Obtenção dos plasmídeos recombinantes para as curvas padrão de DNA</i>	54
4.3.5.2	<i>Preparo das reações para a realização da PCR em tempo real</i>	55
4.3.5.3	<i>Estimativa do número de cópias de RNAr 16S em cada amostra</i>	56
4.3.6	<i>Análise da diversidade microbiana pela técnica de pirosequenciamento</i>	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	DINÂMICA DOS COMPOSTOS NITROGENADOS NO RBS	60
5.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ALIMENTAÇÃO DO RBS COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE FENOL	73
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA NO INTERIOR DO RBS	80
5.4	DETECÇÃO DE BACTÉRIAS ANAMMOX NO RBS	81
5.4.1	<i>PCR</i>	81
5.4.2	<i>FISH</i>	83
5.5	ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE BACTÉRIAS ANAMMOX POR PCR EM TEMPO REAL	84
5.6	ANÁLISE DO PERFIL DA COMUNIDADE MICROBIANA AO LONGO DO TEMPO DE OPERAÇÃO DO REATOR POR PCR-DGGE	88
5.7	ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS NO RBS PELA TÉCNICA DE PIROSEQUENCIAMENTO	95
5.7.1	<i>Caracterização da diversidade microbiana</i>	97
5.7.1.1	<i>Filos</i>	98
5.7.1.2	<i>Gêneros</i>	101
5.7.2	<i>Análise filogenética das UTOs relacionadas a bactérias anammox</i>	111
6	CONCLUSÕES	113
7	RECOMENDAÇÕES	116
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 – Ciclo do Nitrogênio	6
FIGURA 3.2 – Rota metabólica para a oxidação anaeróbia da amônia	13
FIGURA 3.3 – Nova proposta para a rota bioquímica da oxidação anaeróbia da amônia baseada no sequenciamento do genoma de <i>Candidatus</i> “K. stuttgartiensis”. O anammoxossomo, compartimento intracelular representado pela linha cinza, é o local onde ocorre o catabolismo anammox; a enzima hidrazina sintase é mostrada no centro da figura; as setas amarelas indicam o fluxo de elétrons; os quadrados amarelos indicam agrupamentos de ferro-enxofre; grupos Heme b, c, d e hemes atípicos c! são mostrados no interior das unidades e complexos catalíticos.....	14
FIGURA 3.4 – Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula anammox (esquerda) e representação esquemática de uma célula anammox (direita) mostrando o anammoxossomo...	17
FIGURA 3.5 – Estrutura de biofilme formado em um reator com biodiscos para tratamento de efluente de lixiviado de aterro sanitário.	24
FIGURA 3.6 – Fórmula estrutural do fenol	33
FIGURA 4.1 – Representação esquemática do RBS utilizado para o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox. (pH) Sensor de pH; (T) Sensor de Temperatura; (OD) Sensor de oxigênio dissolvido.....	36
FIGURA 4.2 – RBS utilizado para o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox	37
FIGURA 4.3 – Diagrama dos ciclos de operação do RBS evidenciando a duração de cada período predominante na maior parte do experimento.....	38
FIGURA 4.4 – Fluxograma das metodologias utilizadas para a caracterização microbiológica das amostras do inóculo e da biomassa cultivada no RBS. (*) O inóculo corresponde ao tempo zero de operação do RBS; (**) Amostra coletada após 34 dias do início da adição de fenol ao RBS.....	46
FIGURA 4.5 – Marcador de peso molecular <i>GeneRuler Express DNA Ladder</i> 100-5000 pb.	50
FIGURA 4.6 – Marcador de peso molecular <i>Low DNA Mass Ladder</i>	52
FIGURA 5.1 – Dinâmica dos compostos nitrogenados no RBS ao longo do tempo de operação – ciclo longo (16 horas).....	61
FIGURA 5.2 – Dinâmica dos compostos nitrogenados no RBS ao longo do tempo de operação – ciclo curto (8 horas)	61
FIGURA 5.3 – Produção de $N-NO_3^-$ no RBS ao longo do tempo de operação – ciclo longo (16 horas) e curto (8 horas).....	62

FIGURA 5.4 – Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/ consumo de amônia e da produção de nitrato/ consumo de amônia durante toda a fase III de operação – Ciclo longo (16 horas)	64
FIGURA 5.5 – Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/ consumo de amônia e da produção de nitrato/ consumo de amônia durante toda fase III de operação – Ciclo curto (8 horas)	64
FIGURA 5.6 - <i>Box-plot</i> do coeficiente estequiométrico Consumo de NO_2^- / Consumo de N-NH_4^+ obtidos para o RBS durante a fase III (90 a 335 dias), antes da alimentação do reator com fenol.	66
FIGURA 5.7 – <i>Box-plot</i> do coeficiente estequiométrico Produção de N-NO_3^- / Consumo de N-NH_4^+ obtido para o RBS durante a fase III (90 a 335 dias), antes da alimentação do reator com fenol.	67
FIGURA 5.8 – Eficiência de remoção de N-NH_4^+ e N-NO_2^- no RBS durante todo o período operacional – Ciclo longo (16 horas)	68
FIGURA 5.9 – Eficiência de remoção de N-NH_4^+ e N-NO_2^- no RBS durante todo o período operacional – Ciclo curto (8 horas)	69
FIGURA 5.10 – Cargas de nitrogênio (N-NO_2^- e N-NH_4^+) aplicadas e removidas do RBS ao longo de todo o período operacional	73
FIGURA 5.11 – Dinâmica e eficiência de remoção dos compostos nitrogenados no RBS durante o experimento de alimentação do reator com fenol (ciclo longo).	74
FIGURA 5.12 – <i>Box-plot</i> das eficiências de remoção de N-NO_2^- durante o experimento de alimentação do reator com fenol.	76
FIGURA 5.13 – <i>Box-plot</i> das eficiências de remoção de N-NH_4^+ durante o experimento de alimentação do reator com fenol	77
FIGURA 5.14 – <i>Box-plot</i> dos coeficientes N-NO_2^- consumido/ N-NH_4^+ consumido durante o experimento de alimentação do reator com fenol.....	78
FIGURA 5.15 – Granulação da biomassa no RBS. (A) Biomassa no início da operação do RBS; (B) Biofilme formado na parede do RBS com coloração marrom alaranjada; (C) Grânulos formados no interior do RBS. (D) Grânulos retirados do RBS.	80
FIGURA 5.16 – Detecção de bactérias anammox pela PCR com iniciadores para o DNAr 16S de bactérias anammox (Pla 46f/ Amx 820r).....	81
FIGURA 5.17 – Detecção de bactérias anammox pela PCR com iniciadores para a subunidade <i>HzsA</i> da enzima hidrazina sintase de bactérias anammox (<i>HzsA</i> 526f/ <i>HzsA</i> 1857r).	82
FIGURA 5.18 – Detecção de bactérias anammox no RBS após 190 dias de cultivo pela técnica de FISH. (A e C) Células coradas com DAPI. (B e D) Células de bactérias anammox hibridadas com a sonda Amx 820 (específica para os gêneros <i>Candidatus</i> “Brocadia” e “Kuenenia”).	83

FIGURA 5.19 – Estimativa do número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox ao longo da operação do RBS.....	85
FIGURA 5.20 – Carga de nitrogênio removida no RBS (linha azul) e número de cópias de RNAr 16S de bactérias anammox (quadrados vermelhos) ao longo do tempo de operação....	86
FIGURA 5.21 – Abundância relativa do número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox em relação ao número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias totais ao longo da operação do RBS.	87
FIGURA 5.22 – Gel de DGGE contendo fragmentos de DNAr 16S amplificados com <i>primers</i> universais para bactérias em geral (1055F/1392R-GC). (1) Inóculo; (2) RBS 110 dias; (3) RBS 190 dias; (4) RBS 270 dias; (5) RBS 330 dias; (6) RBS 370 dias.....	88
FIGURA 5.23 – Dendrograma obtido para os perfis de bandas do inóculo e RBS aos 110, 190, 270, 330 e 370 dias (coeficiente de correlação de Pearson e método de agrupamento UPGMA).	89
FIGURA 5.24 – Imagem invertida do gel de DGGE evidenciando as bandas que foram recortadas do gel e sequenciadas (setas vermelhas). (1) Inóculo; (2) RBS 110 dias; (3) RBS 190 dias; (4) RBS 270 dias; (5) RBS 330 dias; (6) RBS 370 dias.	90
FIGURA 5.25 – Possível rota para degradação anaeróbia de fenol incluindo a degradação do benzoato.....	94
FIGURA 5.26 – Degradação aeróbia de fenol por <i>Pseudomonas putida</i>	95
FIGURA 5.27 – Histograma da distribuição do comprimento das sequências obtidas.	96
FIGURA 5.28 – Abundância relativa dos filos mais representativos na biomassa do RBS aos 270 dias de operação (97% de similaridade).....	98
FIGURA 5.29 – Abundância relativa dos gêneros mais representativos observados na biomassa do RBS aos 270 dias de operação (97% de similaridade).	101
FIGURA 5.30 – Árvore filogenética apresentando a posição das UTOs relacionadas à bactérias anammox obtidas pelo pirosequenciamento da amostra de biomassa do RBS coletada aos 270 dias de operação. Os números nos nós da árvore representam a porcentagem de recuperação dos braços relevantes em 1000 análises de reamostragem por <i>Bootstrap</i> . Os números de acesso das sequencias depositadas no <i>GenBank</i> estão indicadas entre parênteses. A barra de escala (0,01) representa uma modificação a cada 100 nucleotídeos.	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Estado de oxidação do nitrogênio em diferentes compostos nitrogenados	5
TABELA 3.2 – Candidatos a gêneros de bactérias anammox descritos na literatura.	16
TABELA 3.3 – Reatores em escala plena existentes no mundo (volume maior que 58 m ³). ...	23
TABELA 3.4 – Concentrações inibitórias de alguns compostos sobre a atividade anammox	32
TABELA 4.1 – Tempos de detenção hidráulica do RBS ao longo do tempo de operação	38
TABELA 4.2 – Composição do meio mineral autotrófico.....	40
TABELA 4.3 – Composição das soluções de micronutrientes	40
TABELA 4.4 – Concentrações de fenol inoculadas no RBS durante o experimento de alimentação com fenol.....	41
TABELA 4.5 – Condições operacionais no RBS no momento das coletas de biomassa realizadas para análises de biologia molecular.....	46
TABELA 4.6 – Iniciadores utilizados nas reações da PCR para detecção de bactérias anammox.	48
TABELA 4.7 – Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR.....	49
TABELA 4.8 – Iniciadores utilizados na reação da PCR para a técnica PCR-DGGE.....	53
TABELA 4.9 - Valores esperados para o número de cópias de DNA das curvas padrão dos ensaios de quantificação absoluta pela PCR em tempo real.....	55
TABELA 4.10 – Concentração dos reagentes utilizados na PCR em tempo real	56
TABELA 4.11 – Iniciadores utilizados nas reações da PCR em tempo real.....	56
TABELA 4.12 – Equações de reta das curvas padrão obtidas nos ensaios da PCR em tempo real	57
TABELA 5.1 – Estatística descritiva dos coeficientes estequiométricos obtidos durante a fase III (90 a 335 dias) antes da alimentação do reator com fenol.	66
TABELA 5.2 – Eficiências médias de remoção de nitrogênio durante as três fases operacionais do RBS (desconsiderando o período da fase III em que o reator foi alimentado com fenol).....	71
TABELA 5.3 – Estatística descritiva das eficiências de remoção de nitrito, amônia e do coeficiente $N-NO_2^- / N-NH_4^+$ sob diferentes concentrações de fenol adicionadas ao RBS	75
TABELA 5.4 – Identificação das bandas do DGGE.....	91

TABELA 5.5 – Índices de diversidade determinados para a amostra analisada (97% de similaridade).....	96
TABELA 5.6 – Número de UTOs classificadas nos diferentes níveis taxonômicos e porcentagem em relação ao total de UTOs (97% de similaridade).....	97
TABELA 5.7 – Abundância relativa de todos os filos observados na biomassa do RBS aos 270 dias de operação (97% de similaridade).....	98
TABELA 5.8 - Abundância relativa de todos os gêneros observados na biomassa do RBS aos 270 dias de operação (97% de similaridade).....	102
TABELA 5.9 – Descrição dos principais gêneros encontrados no RBS após 270 dias de operação.....	103
TABELA 5.10 – UTOs relacionadas a bactérias anammox obtidas pela técnica de pirosequenciamento.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Anammox	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation</i> ou Oxidação Anaeróbia da Amônia
Anammox-SBA	<i>Anaerobic Ammonium Oxidation with Sequential Biocatalyst addition</i>
ANME	<i>Anaerobic Methane Oxidation</i> ou Oxidação Anaeróbia do Metano
AOB	<i>Aerobic Oxidizing Bacteria</i> ou Bactéria Oxidadora de Amônia
APS	Persulfato de amônio
ATP	Adenosina Trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de soro bovina
CANON	<i>Complete Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
COT	Carbono Orgânico Total
DAPI	4-diamino-2-fenilindol
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> ou Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DO	Densidade Óptica
DQO	Demanda Química de Oxigênio
Eq.	Equação
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i> ou Hibridação in situ Fluorescente

INDEAR	Instituto de Agrobiologia Rosario
LB	Luria Bertani
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NOB	<i>Nitrite Oxidizing Bacteria</i> ou Bactéria Oxidadora de Nitrito
OLAND	<i>Oxygen Limitant Autotrophic Nitrification Denitrification</i>
pb	Par de base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RBS	Reator em Batelada Sequencial
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossomal
RPM	Rotações por Minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHARON	<i>Single Reactor for Ammonium Removal Over Nitrite</i>
ST	Sólidos Totais
STV	Sólidos Totais Voláteis
TAE	Tris acetato EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages</i>
UTO	Unidade Taxonômica Operacional
UV	Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um elemento químico essencial para todos os organismos por ser constituinte de moléculas importantes como proteínas e ácidos nucleicos. Seu lançamento indiscriminado nos corpos hídricos pode causar importantes problemas ambientais, sendo um dos mais preocupantes a eutrofização artificial. Os esgotos domésticos e, principalmente, os efluentes industriais constituem fontes expressivas de nitrogênio e, por esse motivo, seu tratamento adequado antes do lançamento nos corpos d'água é imprescindível para a preservação do ambiente e da saúde pública.

A remoção biológica de nitrogênio de efluentes tem sido tradicionalmente realizada por meio da nitrificação autotrófica seguida da desnitrificação heterotrófica. Esses processos são mediados por dois grupos de bactérias com requisitos metabólicos distintos e por isso são requeridas duas etapas diferentes para o tratamento. Na etapa de nitrificação, há muitas vezes demanda de gastos energéticos com aeração, uma vez que esse processo é mediado por bactérias aeróbias. Na etapa de desnitrificação são requeridas condições anaeróbias e pode ser necessária a adição de uma fonte externa de matéria orgânica ao sistema para suprir a demanda de carbono, essencial ao metabolismo das bactérias desnitrificantes.

Como alternativa às tecnologias biológicas convencionais de remoção de nitrogênio, vem sendo estudado nas últimas duas décadas o processo de oxidação anaeróbia da amônia (anammox). O processo anammox foi descoberto ao acaso em um reator desnitrificante na Holanda, no qual foi observado a remoção de nitrogênio amoniacal sob condições anaeróbias, o que não era esperado, uma vez que, até então se pensava que a oxidação da amônia só era possível na presença de oxigênio (MULDER *et al.*, 1995). Verificou-se que o processo anammox era realizado por bactérias anaeróbias capazes de encurtar a oxidação da amônia, transformando-a diretamente a nitrogênio gasoso e utilizando o nitrito como acceptor de elétrons (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996).

A remoção de nitrogênio de efluentes pelo processo anammox possui como principais vantagens a redução de custos operacionais com aeração e a ausência da necessidade de adição de fontes externas de carbono, que são requeridos nos processos de nitrificação e desnitrificação, respectivamente. A principal desvantagem do processo está associada ao lento crescimento das bactérias anammox, o que culmina em um pequeno rendimento de biomassa,

podendo aumentar consideravelmente o tempo de partida de reatores anammox (GAO & TAO, 2011).

Apesar das desvantagens inerentes ao processo anammox, o mesmo vem se mostrando eficiente para o tratamento de efluentes com elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal e baixa relação C/N (carbono/nitrogênio). Essas características são comuns a muitos tipos de despejos industriais, como os lixiviados de aterros sanitários, efluentes das unidades de coquearias da indústria siderúrgica, efluentes de indústrias alimentícias, farmacêuticas, e despejos de suinocultura (EGLI *et al.*, 2003; TOH & ASHBOLT, 2002; LI-DONG *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2011a; MAGRÍ *et al.*, 2012).

No entanto, os despejos industriais, normalmente possuem constituição muito complexa, podendo conter compostos potencialmente inibidores para as bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia. Como um exemplo, é possível citar compostos orgânicos tóxicos como os fenóis, os quais estão presentes em uma ampla gama de efluentes industriais (JIN *et al.*, 2012).

Estudos sobre a inibição do processo anammox por fenóis são ainda raros na literatura. Toh e Ashbolt (2002) submeteram uma cultura de bactérias anammox a um efluente sintético contendo fenol, simulando efluente de coquearia, a fim de avaliar se este composto iria interferir no metabolismo desses organismos quanto ao consumo de nitrogênio. Os resultados deste estudo foram satisfatórios e sugeriram que o processo anammox possui potencial para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes contendo fenol. Em estudo mais recente foi avaliada a toxicidade conjunta de fenol e cobre (compostos tipicamente encontrados em despejos de coquearia) e fenol e sulfeto (tipicamente encontrados em efluentes da indústria petroquímica), a fim de avaliar se o processo anammox poderia ser aplicado para o tratamento desses efluentes (YANG & JIN, 2012).

Não obstante, para a aplicação desse processo no tratamento de despejos industriais que possuam esse tipo de composto tóxico em sua constituição, maiores investigações ainda são necessárias. Além disso, ainda não foi relatado na literatura como a adição de fenol em reatores operados sob condições anammox pode interferir na comunidade microbiana desses reatores.

Nesse contexto, o presente trabalho se justifica na relevância associada ao estudo de tecnologias economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis para a remoção de

nitrogênio de efluentes, como é o caso do processo anammox. No entanto, sua aplicação depende da disponibilidade de biomassa anammox e do sucesso na manutenção da cultura desses organismos. Assim, trabalhos que têm como o objetivo o cultivo de biomassa anammox a partir de uma cultura microbiana mista são importantes para viabilizar a aplicação do processo para o tratamento de efluentes. Dessa forma, o cultivo e a manutenção dessa biomassa pode possibilitar sua utilização como inóculo para a partida de reatores anammox, contribuindo, dessa forma, para a difusão do processo.

Além disso, apesar dos avanços nos estudos acerca do processo anammox e do sucesso de sua aplicação em diversos países, trabalhos que utilizaram esse processo para tratamento de efluentes contendo compostos tóxicos, como os fenóis, são raros na literatura e necessitam de maiores investigações, a fim de avaliar a viabilidade da aplicação do processo anammox para o tratamento de efluentes que apresentam elevada toxicidade.

Há alguns anos, o processo anammox vem sendo objeto de estudo do Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais. Campos (2011) realizou com sucesso o enriquecimento de bactérias anammox em um reator em batelada sequencial a partir de lodo ativado convencional de estação de tratamento de esgotos domésticos e, além disso, caracterizou por meio de técnicas de biologia molecular as bactérias anammox e outras bactérias do ciclo de nitrogênio (oxidadoras de amônia e nitrito) presentes na cultura enriquecida. Desse modo, além da importância associada aos estudos acerca do processo anammox já mencionada anteriormente, o presente trabalho é também relevante, pelo fato de dar continuidade aos estudos desenvolvidos por Campos (2011), fornecendo informações adicionais acerca do desenvolvimento do processo anammox em reatores em bateladas sequenciais, sobre o efeito de compostos tóxicos na atividade desses organismos e, além disso, sobre a dinâmica da comunidade microbiana ao longo do tempo em reatores operados sob condições anammox.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Cultivar bactérias com atividade anammox a partir de lodo ativado de estação de tratamento de esgotos domésticos em reator em batelada sequencial (RBS), caracterizar a comunidade microbiana desenvolvida no RBS e avaliar o efeito do fenol sobre o processo anammox.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a eficiência de remoção de nitrogênio pelo processo anammox em RBS submetido a concentrações crescentes de nitrogênio amoniacal.
- Avaliar o efeito de concentrações crescentes de fenol na remoção de nitrogênio por bactérias anammox no RBS.
- Estudar a diversidade e a dinâmica da comunidade microbiana desenvolvida no RBS ao longo do tempo de operação, analisando comparativamente a comunidade antes e após a alimentação do reator com fenol e identificar filogeneticamente os organismos anammox cultivados no reator.
- Quantificar as bactérias anammox presentes no reator ao longo do tempo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Ciclo do nitrogênio

O nitrogênio (N₂) está presente de forma abundante na Terra, representando cerca de 78% dos gases atmosféricos. Porém quando se encontra na forma de N₂ é quimicamente inerte não podendo ser utilizado diretamente pelos organismos, com exceção de poucos procaríotos. Por isso, o suprimento e a ciclagem desse composto dependem da decomposição biológica de moléculas nitrogenadas complexas. O nitrogênio é um elemento químico essencial a todos os organismos, por participar da constituição de moléculas orgânicas imprescindíveis à vida como proteínas e ácidos nucleicos.

No ambiente, o nitrogênio pode sofrer uma variedade de oxidações e reduções que produzem compostos com estados de oxidação variando de +5 a -3 (Tabela 3.1). Reações redox são realizadas de diferentes maneiras por distintos organismos, sendo que essas reações em conjunto compõem o ciclo do nitrogênio (Figura 3.1).

TABELA 3.1 – Estado de oxidação do nitrogênio em diferentes compostos nitrogenados

Composto nitrogenado	Fórmula	Estado de oxidação
Amônio	NH ₄ ⁺	-3
Hidrazina	N ₂ H _{4(aq)}	-2
Hidroxilamina	NH ₂ OH _(aq)	-1
Gás dinitrogênio	N _{2(g)}	0
Óxido nitroso	N ₂ O _(g)	+1
Óxido nítrico	NO _(g)	+2
Nitrito	NO ₂ ⁻	+3
Dióxido de nitrogênio	NO _{2(g)}	+4
Nitrato	NO ₃ ⁻	+5

Fonte: Adaptado de Jetten *et al.*, 2009.

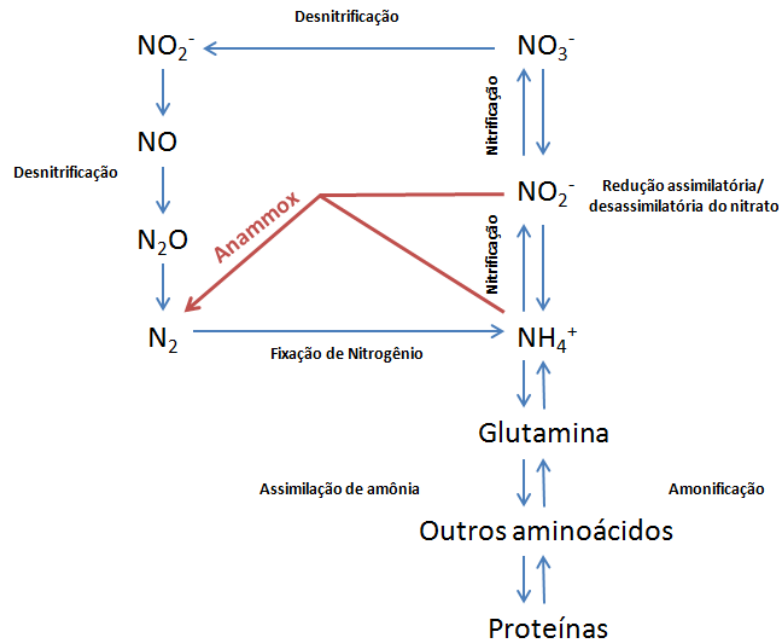


FIGURA 3.1 – Ciclo do Nitrogênio

Do ponto de vista microbiológico as transformações no ciclo do nitrogênio acontecem através de processos catabólicos como nitrificação, desnitrificação, redução desassimilatória do nitrato e oxidação anaeróbica da amônia e processos anabólicos, como redução assimilatória do nitrato, assimilação e fixação de nitrogênio (JETTEN *et al.*, 2009). Esses processos serão descritos de maneira mais detalhada nos itens subsequentes.

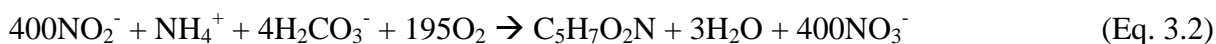
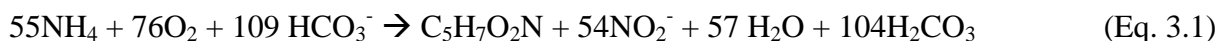
3.1.1 Nitrificação

A nitrificação é um processo que envolve a oxidação quimiolitotrófica de amônia a nitrato sob condições estritamente aeróbias. Esse processo é conduzido em duas etapas sequenciais de oxidação. Na primeira etapa a amônia é oxidada a nitrito por bactérias oxidadoras de amônia (AOB, do inglês *ammonium oxidizing bacteria*). A segunda etapa envolve a oxidação do nitrito a nitrato e é mediado pelas bactérias oxidadoras de nitrito (NOB, do inglês *nitrite oxidizing bacteria*).

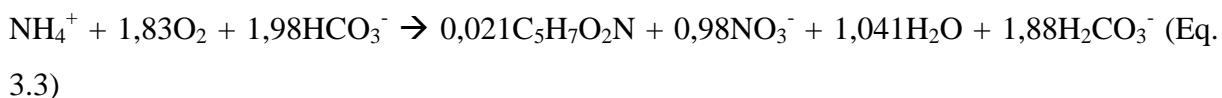
Dentre os microrganismos oxidadores de amônia podem-se citar as bactérias dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* e *Nitrosolobus*, as quais, em geral são encontradas em uma ampla gama de ambientes como solos, esgotos, águas doce e marinha. As bactérias oxidadoras de nitrito são representadas pelos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*,

entre outras. Esse grupo de microrganismos pode ser encontrado em ambientes similares aos das oxidadoras de amônia. (MADIGAN *et al.*, 2010; AHN, 2006).

As Equações 3.1 e 3.2 apresentam a estequiometria do processo de oxidação aeróbia da amônia e do nitrito, respectivamente (AHN, 2006).



A partir das equações acima, pode ser obtida a equação global para a nitrificação (Equação 3.3).



No processo de nitrificação, várias enzimas estão envolvidas na oxidação dos compostos nitrogenados reduzidos. Em bactérias oxidadoras de amônia, a enzima amônia mono-oxigenase, localizada na membrana celular é responsável pela oxidação do íon amônio, produzindo hidroxilamina e água. Posteriormente, uma segunda enzima chave, a hidroxilamina oxidoreductase, localizada no periplasma celular, oxida a hidroxilamina a nitrito. As bactérias oxidadoras de nitrito utilizam a enzima nitrito oxidoreductase para oxidar o nitrito a nitrato (MADIGAN *et al.*, 2010; JETTEN *et al.*, 2009).

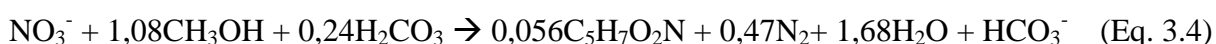
As reações mediadas pelas bactérias nitrificantes geram pequena quantidade de energia. Dessa maneira, o crescimento global desses microrganismos (gramas de células produzidas por mol de substrato oxidado) é relativamente baixo (MADIGAN *et al.*, 2010; JETTEN *et al.*, 2009). Para *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* o rendimento de biomassa é de 0,15 e 0,02 mg de células por miligrama de N-NH₄⁺ oxidado, respectivamente (AHN, 2006).

3.1.2 Desnitrificação

A desnitrificação heterotrófica é a transformação do nitrato a nitrogênio gasoso e consiste em um processo redutivo, sendo, portanto, uma forma de respiração. Este é um processo de bioconversão heterotrófica, realizado em condições anóxicas. Nesse processo, o nitrato ou o

nitrito funcionam como acceptor alternativo de elétrons durante a respiração na ausência de oxigênio. Na desnitrificação completa, o nitrato é reduzido a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso e, por fim a nitrogênio gasoso (MADIGAN *et al.*, 2010; BOTHE *et al.*, 2007).

As bactérias desnitrificantes, são em sua maioria, anaeróbias facultativas heterotróficas e podem utilizar uma ampla variedade de compostos orgânicos como doadores de elétrons, como por exemplo: metanol, acetato, glicose, etanol, entre muitos outros. A Equação 3.4 representa a desnitrificação utilizando o metanol como fonte de elétrons, incluindo a síntese celular (AHN, 2006).



A primeira etapa da desnitrificação (redução de NO_3^- a NO_2^-) envolve uma enzima integral de membrana, a nitrato redutase, cuja síntese é inibida pelo oxigênio molecular. Na segunda etapa da via (transformação do NO_2^- a NO) atua a enzima nitrito redutase. As etapas subsequentes da desnitrificação, redução de NO a N_2O e redução de N_2O a N_2 , são mediadas pelas enzimas óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, respectivamente. Assim como a primeira enzima envolvida no processo (nitrato redutase), as demais são reguladas de maneira coordenada pela presença de oxigênio. Além disso, a presença de nitrato é essencial para que todas essas enzimas sejam plenamente expressas (MADIGAN *et al.*, 2010).

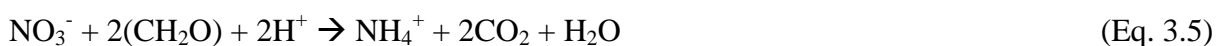
Uma ampla gama de microrganismos é capaz de realizar o processo de desnitrificação, sendo que grande parte deles são bactérias gram-negativas e pertence aos grupos *alfa* e *beta* do filo *Proteobacteria* como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Thiobacillus*. Algumas bactérias gram-positivas como as do gênero *Bacillus* e poucas arqueias halogênicas também são capazes de realizar a desnitrificação (AHN, 2006). Algumas bactérias realizam a desnitrificação de forma completa como, por exemplo, *Paracoccus denitrificans* e *Pseudomonas stutzeri*. Algumas, entretanto, realizam apenas a primeira etapa do processo (redução do NO_3^- a NO_2^-), como é o caso da bactéria *Escherichia coli* (BOTHE *et al.*, 2007; MADIGAN *et al.*, 2010; JETTEN *et al.*, 2009).

3.1.3 Oxidação anaeróbia da amônia

A oxidação anaeróbia da amônia foi descoberta há quase duas décadas e envolve a oxidação do íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso, utilizando o nitrito como aceptor de elétrons (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996). A descoberta desse processo foi vista como uma revolução no ciclo convencional do nitrogênio, uma vez que anteriormente se considerava que a oxidação da amônia era possível apenas em condições aeróbias. Por se tratar do tema de maior relevância deste trabalho, o processo anammox será abordado com maiores detalhes no item 3.2.

3.1.4 Redução desassimilatória do nitrato

A redução desassimilatória do nitrato é realizada em duas etapas. A primeira, também denominada de respiração do nitrato, consiste na redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), e é seguida pela redução do nitrito ao íon amônio (NH_4^+) (BOTHE *et al.* 2007). Esse processo, bastante investigado na bactéria *Bacillus subtilis*, ocorre na ausência de oxigênio e tem como objetivo dissipar o excesso de potencial redutor ou gerar amônia para assimilação e crescimento celular anaeróbio (YE & THOMAS, 2001). O processo ocorre em ambientes com características altamente redutoras, como, por exemplo, sedimentos anaeróbios marinhos, fontes termais ricas em sulfeto (S^{2-}), trato gastrointestinal humano e de animais de sangue quente (BOTHE *et al.*, 2007). O processo geral da redução desassimilatória do nitrato pode ser representado pela Equação 3.5.



3.1.5 Redução assimilatória do nitrato

A redução assimilatória do nitrato, assim como a redução desassimilatória envolve a redução do nitrato a íon amônio (Equação 3.5), o qual será utilizado na biossíntese celular. Este processo, entretanto, ocorre tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, não resulta em rendimento energético e o produto, íon amônio, não é excretado para o meio extracelular. A quantidade de nitrogênio reduzido nesse processo depende da demanda para a produção de biomassa. Quando existe grande concentração do íon amônio o processo é inibido ou torna-se insignificante (TIEDJE, 1988 *apud* KIELING, 2004).

3.1.6 Assimilação da amônia

Durante a assimilação da amônia, esse composto, resultante da redução de nitrato, é incorporado na célula aos compostos de carbono, via enzimas glutamina sintase e glutamato sintase. Em um primeiro momento, a amônia se combina com o glutamato formando a glutamina e posteriormente, outros aminoácidos são formados, os quais se ligam formando as proteínas. A amonificação consiste no processo contrário à assimilação da amônia, em que os compostos nitrogenados liberados das células sofrem hidrólise por meio de enzimas bacterianas, resultando na liberação de grupos amina, que resulta na produção de nitrogênio reduzido sob duas formas: amônia livre (NH₃) ou ionizada (NH₄⁺) (BOTHE *et al.*, 2007).

3.1.7 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste na redução de nitrogênio gasoso (N₂) a íon amônio (NH₄⁺) (Equação 3.6) (KIELING, 2004). Esse processo é essencial para obtenção de fonte de nitrogênio para as necessidades biossintéticas celulares. Consiste, portanto, em um processo anabólico, e os microrganismos capazes de realizar tal processo são livres da dependência de utilizar formas fixadas de nitrogênio, como amônia ou nitrato, conferindo-lhes uma vantagem ecológica significativa (MADIGAN *et al.*, 2010).



Somente alguns procariotos são capazes de fixar N₂. Dentre eles, alguns são de vida livre e outros só conseguem realizar esse processo quando associados com determinados tipos de plantas. Dentre os microrganismos de vida livre, é possível citar os aeróbios *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Thiobacillus* e os anaeróbios *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*, entre outros. Em relação aos microrganismos que fixam nitrogênio em simbiose com plantas é possível citar as bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Azorhizobium* em associação com plantas leguminosas como soja, ervilha, trevo, alfarrobeira. A importância da fixação biológica de nitrogênio, portanto, está associada à disponibilização de formas assimiláveis desse composto para outros organismos, como animais e plantas. Algumas formas de fixação de nitrogênio são de enorme relevância agrícola, disponibilizando este elemento para culturas essenciais, como por exemplo, a soja (MADIGAN *et al.*, 2010).

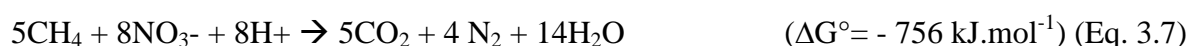
3.1.8 Novos processos envolvidos no ciclo do nitrogênio

Durante mais de um século se pensava que o ciclo do nitrogênio estava totalmente compreendido. No entanto, o que se tem observado atualmente é que o conhecimento sobre uma ampla gama de microrganismos que tem papel importante nesse ciclo foi e é ainda hoje negligenciado. Processos parciais e interações microbianas altamente complexas são ainda pouco estudados e necessitam de maior atenção a fim de esclarecer mecanismos de conversão ainda não compreendidos totalmente dentro deste ciclo (KARTAL *et al.*, 2012).

A nitrificação heterotrófica, por exemplo, já foi verificada em diversos organismos como bactérias e fungos. Nesse processo a amônia pode ser oxidada ou nitrogênio pode ser reduzido a partir de compostos orgânicos até hidroxilamina, nitrito e nitrato. A nitrificação heterotrófica parece não estar envolvida no metabolismo energético dos microrganismos que a realizam, e não contribui para o crescimento celular. O papel fisiológico desse processo e a diversidade filogenética dos microrganismos que o realizam ainda não é totalmente compreendido. Sabe-se que as bactérias *Paracoccus denitrificans*, *Alcaligenes faecalis* e *Pseudomonas putida* são capazes de realizá-lo. No entanto, especula-se que a nitrificação heterotrófica exerce um papel importante em solos ácidos, como os solos de florestas (HAYATSU *et al.*, 2008).

Alguns microrganismos são capazes de realizar a nitrificação e desnitrificação simultaneamente (processo denominado nitrificação desnitrificante), em condições óxicas ou anóxicas, gerando N_2O ou N_2 como produto final. A bactéria *Nitrosomonas eutropha* pode realizar a nitrificação ou também realizar a desnitrificação utilizando H_2 como doador de elétrons e NO_2^- como acceptor final. *Nitrosomonas europea* também é capaz de realizar a desnitrificação até óxido nítrico N_2O (AHN, 2006). O papel fisiológico desse processo ainda não está claramente elucidado. Não obstante, são propostas três hipóteses para a ocorrência da nitrificação desnitrificante: (1) esta pode ser uma estratégia para reduzir a competição pelo oxigênio com bactérias oxidadoras de nitrito, por meio da remoção do substrato dessas bactérias, o nitrito; (2) Bactérias oxidadoras de amônia usam nitrito como acceptor de elétrons para obter energia em ambientes com baixas concentrações de oxigênio e; (3) A nitrificação desnitrificante é usada para proteger as células das bactérias oxidadoras de amônia da toxicidade associada ao nitrito, produzido durante a oxidação da amônia. No entanto, para confirmar estas hipóteses, mais estudos devem ser realizados (HAYATSU *et al.*, 2008).

O processo de oxidação anaeróbia do metano (ANME, do inglês *anaerobic methane oxidation*) acoplado à desnitrificação é uma recente descoberta no ciclo do nitrogênio e parece estar associado a alguns tipos de arqueias e a bactérias do filo NC10 (RAGHOEBARSING *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2010). As estequiometrias propostas para esta reação são apresentadas pelas Equações 3.7 e 3.8 (RAGHOEBARSING *et al.*, 2006). O papel desse processo na remoção de nitrogênio em sistemas de tratamento de efluentes vem sendo investigado, assim como as interações das bactérias que realizam a ANME acoplada à desnitrificação e outros microrganismos do ciclo do nitrogênio (ZHU *et al.*, 2010).



A oxidação anaeróbia da amônia (anammox) também pode ser considerada uma novidade no ciclo do nitrogênio. Há aproximadamente 18 anos, grande atenção tem sido atribuída às bactérias envolvidas no processo anammox, com intuito de esclarecer seu papel no ambiente e aprimorar sua aplicação tecnológica em sistemas de tratamento de efluentes, conforme será abordado nos tópicos seguintes desta revisão.

3.2 Processo Anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation)

Até o final do século XX acreditava-se que o íon amônio era inerte à ausência de oxigênio. No entanto, em 1977 através de cálculos termodinâmicos, o bioquímico austríaco Broda previu a existência de um organismo que fosse capaz de oxidar a amônia a nitrogênio gasoso em condições anóxicas utilizando o nitrito ou o nitrato como aceptor de elétrons (BRODA, 1977).

Anos depois, Mulder *et al.* (1995) verificaram consumo de amônia em condições anóxicas em um reator desnitrificante de leito fluidizado tratando efluente de uma companhia de produção de fermento em Delft (Holanda). Observou-se concomitantemente o desaparecimento de nitrato e aumento na produção de nitrogênio gasoso (Equação 3.9). Esse processo foi denominado Anammox (do inglês, *Anaerobic ammonium oxidation*) e até esse momento não era possível afirmar se o que ocorria era uma reação química espontânea ou um processo mediado biologicamente.



Experimentos conduzidos por Van de Graaf *et al.* (1995) confirmaram a natureza biológica da oxidação anaeróbia da amônia. Foram obtidos indícios de que o nitrito também poderia servir como acceptor de elétrons para o processo anammox. Posteriormente, em estudos utilizando um reator de leito fluidizado para o enriquecimento de organismos anammox, constatou-se o enriquecimento de cultura utilizando preferencialmente nitrito em detrimento de nitrato, como acceptor de elétrons (Equação 3.10) (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996).



A rota metabólica para a oxidação anaeróbia da amônia foi elucidada por meio de experimentos que utilizaram compostos marcados com ^{15}N em combinação com espectrometria de massa. Os experimentos demonstraram que o íon amônio (NH_4^+) é biologicamente oxidado com hidroxilamina (NH_2OH) como acceptor de elétrons, sendo que a hidroxilamina é originada a partir da redução do nitrito (NO_2^-). O amônio e a hidroxilamina são transformados em hidrazina (N_2H_4). Posteriormente, a conversão da hidrazina a nitrogênio gasoso (N_2) gera equivalentes de elétrons para a redução de uma nova molécula de nitrito (Figura 3.2). Durante a oxidação do amônio parte do nitrito é convertido a nitrato (NO_3^-) e os equivalentes de redução gerados são utilizados para a fixação do CO_2 e conseqüentemente para o aumento da biomassa (VAN DE GRAAF *et al.*, 1997).

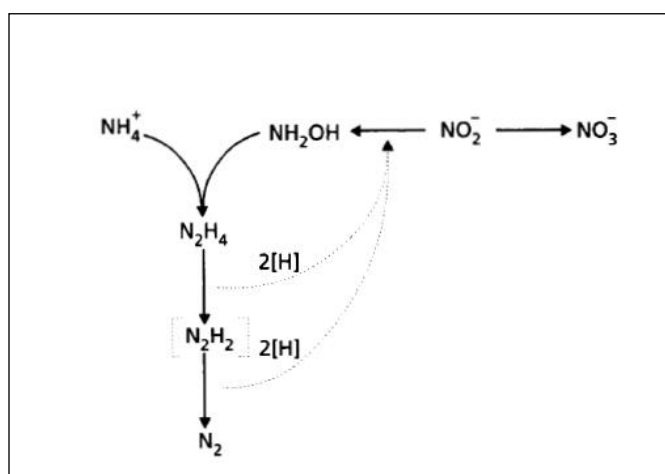


FIGURA 3.2 – Rota metabólica para a oxidação anaeróbia da amônia

Fonte: Van de Graaf *et al.*, 1997.

Mais recentemente, uma nova rota metabólica para a oxidação anaeróbica da amônia foi proposta (Figura 3.3), baseada no sequenciamento do genoma de uma bactéria anammox *Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*” (STROUS *et al.*, 2006). Foi proposto que, primeiramente, o nitrito (NO_2^-) é reduzido a óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico/nitrito oxireductase (NirS) e então a enzima hidrazina sintase (Hzs) produz hidrazina a partir do óxido nítrico e o íon amônio (NH_4^+). Finalmente a hidrazina é oxidada produzindo gás nitrogênio (N_2) por meio da enzima hidrazina oxidoreductase (HZO). Por conseguinte, a enzima nitrato/nitrito oxidoreductase (NarGH) oxida parte do nitrito à nitrato, gerando elétrons para a fixação de CO_2 pela rota da acetil-coenzimaA (KARTAL *et al.*, 2011).

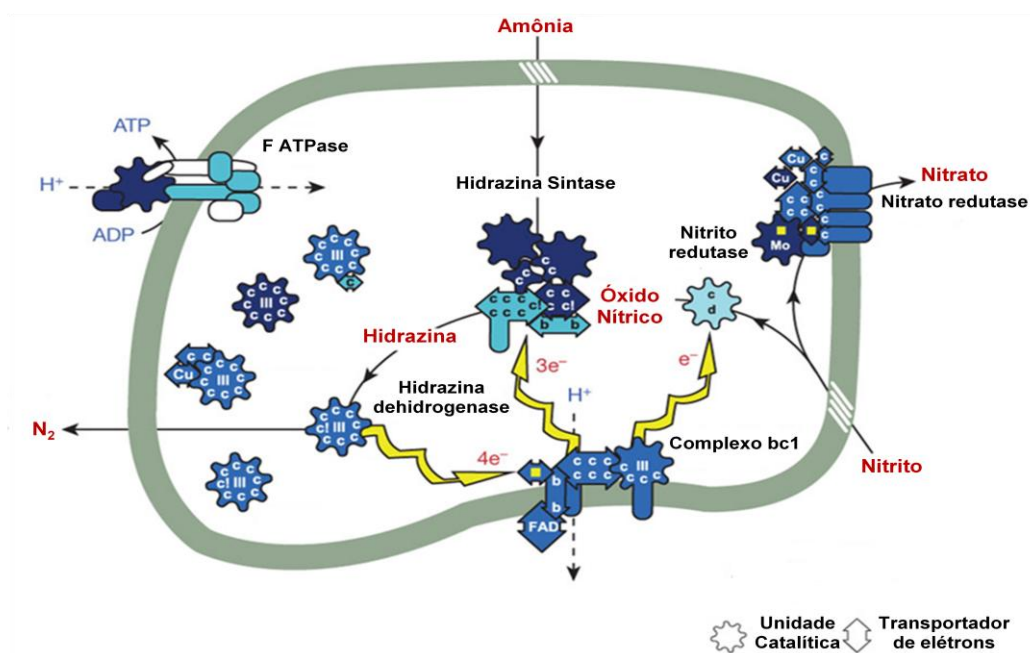


FIGURA 3.3 – Nova proposta para a rota bioquímica da oxidação anaeróbica da amônia baseada no sequenciamento do genoma de *Candidatus* “*K. stuttgartiensis*”. O anammoxossomo, compartimento intracelular representado pela linha cinza, é o local onde ocorre o catabolismo anammox; a enzima hidrazina sintase é mostrada no centro da figura; as setas amarelas indicam o fluxo de elétrons; os quadrados amarelos indicam agrupamentos de ferro-enxofre; grupos Heme b, c, d e hemes atípicos c! são mostrados no interior das unidades e complexos catalíticos.

Fonte: Adaptado de Kartal *et al.*, 2011.

Bactérias anammox possuem forma de cocos, com aproximadamente 1 µm de diâmetro (STROUS *et al.*, 1999a; VAN NIFTRIK *et al.* 2004). Com relação aos aspectos fisiológicos, Strous *et al.* (1999b), definiram as constantes de afinidade por amônia e nitrito como sendo iguais a 0,1 mg N.L⁻¹. O pH ideal para o crescimento de bactérias anammox encontra-se entre 6,7 e 8,3 e a temperatura, entre 20 e 43 °C. No entanto, estes organismos já demonstraram tolerância sob uma ampla faixa de temperaturas, podendo sobreviver em ambientes com temperaturas elevadas (85 °C) e reduzidas (-2 °C) (GAO & TAO, 2011).

As bactérias anammox ainda não foram isoladas por métodos convencionais de microbiologia. Porém, em estudo realizado por Strous *et al.* (1999a) foi possível obter cultura celular anammox com 99,6 % de pureza por meio de centrifugação em gradiente de densidade com *Percoll*. Com base em análises do gene RNAr 16S foi possível identificar o organismo purificado como sendo do filo *Planctomycetes*. A primeira bactéria anammox identificada foi denominada *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”. O termo ‘*Candidatus*’ deve ser adotado, já que ainda não é possível isolar estes organismos utilizando técnicas convencionais de microbiologia. Por esse motivo, técnicas de biologia molecular são imprescindíveis para o estudo dessas bactérias.

Atualmente, são conhecidos seis candidatos a gêneros de bactérias anammox, os quais foram incluídos dentro da ordem *Brocadiales* que constituem um clado monofilético dentro do filo *Planctomycetes* (FUERST & SAGULENKO, 2011). Os gêneros conhecidos de bactérias anammox estão descritos na Tabela 3.2, bem como as espécies que os compõe e os habitats onde são comumente encontrados.

TABELA 3.2 – Candidatos a gêneros de bactérias anammox descritos na literatura.

Gêneros	Espécies	Habitats	Referências
<i>Candidatus</i> “Kuenenia”	<i>Ca.</i> “Kuenenia stuttgartiensis”	sistemas de tratamento de efluentes	Strous <i>et al.</i> (2006)
	<i>Ca.</i> “Brocadia anammoxidans”		Strous <i>et al.</i> (1999a)
<i>Candidatus</i> “Brocadia”	<i>Ca.</i> “Brocadia fulgida” <i>Ca.</i> “Brocadia sinica” <i>Ca.</i> “Brocadia brasiliensis” <i>Ca.</i> “Brocadia caroliniensis”	sistemas de tratamento de efluentes	Kartal <i>et al.</i> (2008) Oshiki <i>et al.</i> (2011) Araújo <i>et al.</i> (2011) Vanotti <i>et al.</i> (2011)
<i>Candidatus</i> “Anammoxoglobus”	<i>Ca.</i> “Anammoxoglobus propionicus”	sistemas de tratamento de efluentes	Kartal <i>et al.</i> (2007)
<i>Candidatus</i> “Jettenia”	<i>Ca.</i> “Jettenia asiática”	sistemas de tratamento de efluentes	Quan <i>et al.</i> (2008)
<i>Candidatus</i> “Brasilis”	<i>Ca.</i> “Brasilis concordiensis”	sistemas de tratamento de efluentes	Viancelli <i>et al.</i> (2011)
<i>Candidatus</i> “Scalindua”	<i>Ca.</i> “Scalindua brodae” <i>Ca.</i> “Scalindua wagneri” <i>Ca.</i> “Scalindua sorokonii” <i>Ca.</i> “Scalindua arabica”	Ambientes marinhos e de água doce, zonas de oxigênio mínimo	Schimid <i>et al.</i> (2003) Woebken <i>et al.</i> (2008)

Os Planctomicetos formam um grupo distinto dentro do Domínio *Bacteria*, o qual possui características bastante peculiares, entre elas a presença de compartimentalização intracelular. No caso das bactérias anammox, além de possuírem um metabolismo único, sendo capazes de oxidar a amônia anaerobiamente, a presença de uma estrutura membranosa intracelular com ausência de ribossomos denominada anamoxossomo (Figura 3.4), torna esse grupo bastante diferente dos demais (STROUS *et al.*, 1999a). As membranas que delimitam o anamoxossomo são formadas de lipídeos singulares, denominados laderanos, que são compostos por anéis de ciclobutano concatenados possuindo ligações do tipo éter ou éster, entre si. Esses lipídeos são considerados marcadores taxonômicos de bactérias anammox e conferem à membrana da célula elevada densidade, fator importante para impedir a saída de compostos intermediários tóxicos do metabolismo anammox, como por exemplo, a hidrazina (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004; FUERST & SAGULENKO, 2011).

Outra característica importante do anamoxossomo é a presença, nesse compartimento, de enzimas importantes necessárias à reação de oxidação anaeróbia da amônia, como a hidrazina sintase e hidroxilamina oxidoreductase (FUERST & SAGULENKO, 2011; JETTEN *et al.*,

2001). Além disso, para que a reação anammox aconteça é necessária que haja a separação entre o anamoxossomo e o riboplasma circundante, para que seja gerada uma força próton motora (FPM) através da membrana do anamoxossomo pela ATP sintase, para a geração de energia na célula (FUERST & SAGULENKO, 2011).

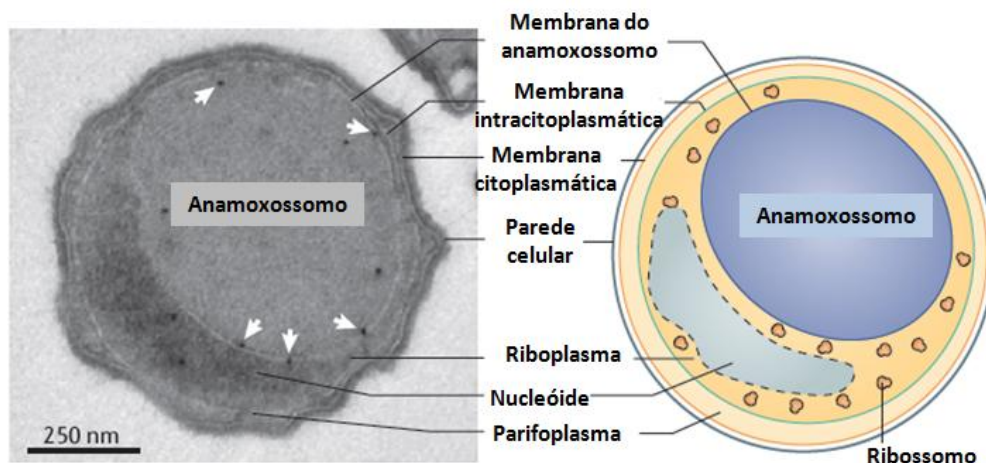
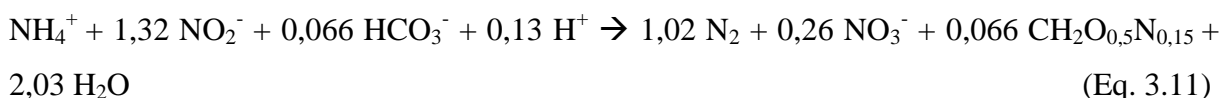


FIGURA 3.4 – Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula anammox (esquerda) e representação esquemática de uma célula anammox (direita) mostrando o anamoxossomo.

Fonte: Adaptado de Fuerst & Sagulenko (2011)

Os organismos anammox apresentam crescimento lento, com taxa de duplicação de aproximadamente onze dias. O modo de crescimento autotrófico dessa bactéria, juntamente com a necessidade de manutenção celular (em decorrência do crescimento lento) resulta em uma estequiometria que apresenta baixa produção de biomassa por mol de amônia consumida (Equação 3.11) (STROUS *et al.*, 1998). Segundo Van Niftrik *et al.* (2004) para que uma molécula de dióxido de carbono seja fixada por bactérias anammox, a reação catabólica de oxidação da amônia deve acontecer 15 vezes.



Por apresentarem crescimento muito lento, durante muito tempo, o cultivo de bactérias anammox tem sido um desafio, devido aos seus longos tempos de duplicação, requerendo técnicas de cultivo que promovam elevada retenção de biomassa e possibilitem o crescimento desses microrganismos em baixas concentrações de substratos, uma vez que, concentrações

demasiadamente elevadas podem inibir sua atividade. Uma das técnicas que atende a esses requisitos é cultivo em reator em batelada sequencial (RBS), que está sendo aplicado com sucesso em muitos laboratórios (STROUS *et al.*, 1998; LÓPEZ *et al.*, 2004; CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007; WANG *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2011).

Por ciclos contínuos de alimentação, sedimentação da biomassa e retirada do líquido sobrenadante, as células são selecionadas por suas propriedades de sedimentação e mantidas no interior dos RBS por tempo indeterminado. Normalmente, são utilizados meios contendo amônia, nitrito e carbonato para o cultivo de anammox. Nitrato também pode ser adicionado ao meio a fim de evitar a formação de baixo potencial redox que pode favorecer o crescimento de microrganismos redutores de sulfato e metanogênicos. Como as bactérias anammox são essencialmente anaeróbias, um gás inerte como N₂ ou Ar é fornecido para retirar o oxigênio do meio (KARTAL *et al.*, 2012).

As bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia possuem um metabolismo singular, sendo capazes de encurtar o processo da oxidação do íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso, utilizando o nitrito como aceptor de elétrons. Por isso, o processo anammox se mostra muito atraente para a remoção de nitrogênio amoniacal de águas residuárias, especialmente aquelas que contenham elevada concentração de amônia e pouca matéria orgânica. No entanto, a aplicação desse processo é ainda limitada, primeiramente, pela baixa disponibilidade de biomassa. Além disso, há a necessidade de um rigoroso controle do processo, em que o pH, a concentração de oxigênio e a concentração de nitrito e amônia fornecidos sejam mantidos em condições ótimas para que a reação anammox ocorra de maneira eficiente. Nesse contexto, o enriquecimento de bactérias anammox a partir de uma população microbiana mista torna-se essencial para o estudo de tais organismos e para a utilização do processo anammox em sistemas de tratamento.

3.3 Aplicação do processo anammox para remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes

O lançamento indiscriminado de compostos nitrogenados nos corpos d'água pode acarretar importantes problemas ambientais, sendo um dos mais preocupantes, a eutrofização artificial. A eutrofização é caracterizada por um aumento de nutrientes como nitrogênio e fósforo nos corpos hídricos levando a profundas modificações nas comunidades aquáticas, nas condições

físicas e químicas do meio e no nível de produção do sistema, sendo, portanto, considerada uma forma de poluição.

Quando lançado no corpo d'água o nitrogênio gera uma demanda no consumo de oxigênio dissolvido no meio, para que o processo bioquímico de conversão de amônia a nitrato ocorra, podendo trazer prejuízos à vida aquática. Além disso, o nitrogênio na forma de amônia livre é diretamente tóxico aos peixes. No que tange à saúde pública, quando esse elemento químico encontra-se na forma de nitrato, pode estar associado a doenças como a metahemoglobinemia em crianças, também conhecida como síndrome do bebê azul. Ademais, o nitrato também pode estar relacionado à ocorrência de câncer gástrico em adultos (VON SPERLING, 2005; LUZ *et al.*, 2008; CASTAÑEDA-CHAVEZ *et al.*, 2010).

Os efluentes domésticos e industriais podem constituir fontes expressivas de nitrogênio, e necessitam, portanto, de tratamento adequado antes de serem lançados nos corpos hídricos. Devido aos danos ambientais intrínsecos ao lançamento de nitrogênio nos corpos d'água a Resolução CONAMA 430/2011, estabelece, em seu artigo 16, o valor de 20 mg.L^{-1} de nitrogênio amoniacal como a concentração máxima a ser lançada em corpos hídricos. No entanto, esse padrão de lançamento atualmente é aplicável para efluentes industriais, não sendo exigido para esgotos sanitários (BRASIL, 2011).

Convencionalmente, a remoção biológica de nitrogênio amoniacal de efluentes é realizada pelos processos de nitrificação aeróbia e seguida por desnitrificação anaeróbia. No entanto, para utilização dessa técnica, são necessárias duas etapas com requisitos biológicos distintos e, portanto, há a demanda de dois tipos de reatores diferentes. Além disso, em vários tipos de efluente, os baixos níveis de carbono orgânico são insuficientes para que ocorra uma desnitrificação completa, sendo necessário fornecer fontes externas de carbono (AHN, 2006).

Atualmente, as pesquisas relacionadas à remoção de nutrientes buscam a otimização dos processos já existentes e o desenvolvimento de novos processos, de modo a aumentar a eficiência e reduzir os custos do tratamento. Para isso é imprescindível entender quais os microrganismos envolvidos e como os mesmos atuam durante os processos bioquímicos de conversão dos poluentes nos diferentes tipos de tratamento estudados.

Como opção aos processos comumente utilizados para a remoção biológica de nitrogênio, tem surgido várias alternativas. Uma delas, bastante estudada atualmente é o processo de oxidação anaeróbia da amônia ou anammox.

Em relação aos processos convencionais de remoção de nitrogênio (nitrificação/desnitrificação), o processo anammox traz uma economia de cerca de 90% nos custos operacionais e 50% de redução de área requerida. As principais vantagens associadas à oxidação anaeróbia da amônia são (GAO & TAO, 2011; JETTEN *et al.*, 2009; ABMA *et al.*, 2007; VAN DER STAR *et al.*, 2007):

(i) Não é necessário fornecer uma fonte de carbono orgânico, já que as bactérias utilizam a amônia como doador de elétrons;

(ii) Não há demanda de gastos energéticos para aeração, uma vez que o processo anammox é anaeróbio;

(iii) O processo é benéfico para o controle do efeito estufa, pois CO₂ não é gerado pelo processo, mas é necessariamente consumido pelas bactérias. Além disso, o processo não gera N₂O. Tanto o CO₂ quanto o N₂O, dois dos principais gases causadores do efeito estufa na atmosfera, são gerados durante o processo de desnitrificação heterotrófica.

(iv) A geração de lodo pode ser reduzida no processo anammox devido à baixa taxa de crescimento dos organismos, o que promove redução de custos no gerenciamento do lodo.

(v) Têm sido reportadas cargas de nitrogênio removidas tão altas quanto 10 kg N.m⁻³.d⁻¹ (experimentos em escala plena) e 75 kg N.m⁻³.d⁻¹ (experimentos em escala laboratorial), cerca de cinco a dez vezes maiores que a remoção de nitrogênio pelos processos de nitrificação/desnitrificação.

Uma das principais desvantagens do processo anammox está associada à baixa taxa de crescimento dos organismos, o que eleva consideravelmente o período de partida de reatores anammox. No entanto, na medida em que essa tecnologia for difundida e mais reatores anammox forem surgindo, esse deixará de ser um problema, uma vez que haverá maior disponibilidade de biomassa anammox que poderá ser utilizada para a partida de novos reatores (GAO & TAO, 2011). Outra relevante limitação do processo está associada à

necessidade de controle rigoroso do pH, da concentração de oxigênio dissolvido e do fornecimento de nitrito em proporções estequiométricas para que a reação anammox possa ocorrer (SCHEEREN *et al.*, 2011).

Atualmente não é aconselhável a utilização de lodo de estação de tratamento convencional como inóculo de reatores anammox em escala plena. Normalmente, o procedimento que vem sendo realizado é a inoculação de reatores em escala plena com biomassa previamente desenvolvida em reatores anammox que já se encontram em operação (GAO & TAO, 2011). Porém, esse procedimento muitas vezes dificulta a disseminação da tecnologia, já que os reatores anammox em escala plena existentes estão situados na Holanda, Suíça, Japão, Alemanha, Áustria, China e Reino Unido, e o transporte da biomassa a partir desses países para outras localidades como o Brasil, por exemplo, é muitas vezes inviável. Nesse sentido, experimentos que têm como objetivo o cultivo e aumento da população de bactérias anammox são importantes para a obtenção de biomassa disponível e em quantidade suficiente para que posteriormente possa ser usada como inóculo de reatores de maior escala, reduzindo assim, seu tempo de partida.

Para a utilização do processo anammox em escala plena é necessário que parte da amônia afluente seja primeiramente oxidada a nitrito. Esse passo pode ser realizado em diferentes reatores nos quais predominam a nitrificação parcial da amônia a nitrito. Pode-se citar os reatores do tipo SHARON (*Single Reactor System for High Ammonium Removal over Nitrite*) (VAN DONGEN *et al.*, 2001; VAN DER STAR *et al.*, 2007) e reatores nitrificantes com biomassa granular (VAZQUEZ-PADIN *et al.*, 2009a).

Outra possibilidade seria a realização da nitrificação parcial e da oxidação anaeróbia da amônia em um mesmo reator. Nesse caso são fornecidas baixas concentrações de oxigênio que proporcionam condições microaeróbias sob as quais bactérias oxidadoras de amônia são capazes de oxidar parcialmente a amônia a nitrito, consumindo o oxigênio dissolvido do meio e formando assim, vários nichos anóxicos. Nesses nichos, as bactérias anammox podem se desenvolver, consumindo o restante da amônia e utilizando o nitrito resultante da nitrificação parcial, culminando na produção de nitrogênio gasoso (VAZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2010). Estas reações podem ocorrer, por exemplo, em reatores do tipo OLAND - *Oxygen Limitant Autotrophic Nitrification Denitrification* (KUI & VERSTRAETE, 1998) e CANON –

Complete Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite (THIRD *et al.*, 2001; VAZQUEZ-PADÍN *et al.*, 2009b).

O primeiro reator anammox em escala plena foi construído em Rotterdam (Holanda), em uma estação de tratamento de águas municipais. O reator tem um volume de 70 m³ e funciona em combinação com um reator SHARON para o tratamento de licor amoniacal proveniente da digestão do lodo da estação, o qual possui concentração média de nitrogênio amoniacal igual a 1200 mg.L⁻¹. A biomassa anammox foi enriquecida a partir de lodo nitrificante convencional, por isso a partida do reator demorou aproximadamente dois anos e meio, em decorrência do lento crescimento desses organismos. Durante o período de partida, a conversão simultânea de amônia e nitrito não foi observada, no entanto, a técnica da PCR em tempo real foi muito importante para indicar que o crescimento da população de bactérias anammox estava acontecendo no interior do reator. Novecentos dias após a partida do reator, a atividade anammox foi iniciada. A carga máxima de nitrogênio aplicada ao reator foi de 750 kg.d⁻¹, e a carga volumétrica superior a 10 kg N.m⁻³.d⁻¹, sendo que o reator é capaz de remover 90% a 95% do nitrogênio afluente (VAN DER STAR *et al.*, 2007).

O sucesso da experiência com o primeiro reator anammox em escala plena resultou na aplicação dessa tecnologia em algumas estações de tratamento ao redor do mundo. Até o presente momento, doze reatores anammox em escala plena (volume igual ou superior a 58 m³) estão em operação, tratando diferentes tipos de efluentes com elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal (GAO & TAO, 2011) (Tabela 3.3).

TABELA 3.3 – Reatores em escala plena existentes no mundo (volume maior que 58 m³).

Local	Tempo de partida (meses)	Inóculo	Volume (m ³)	Carga de N removida (Kg N.d ⁻¹)	Tipo de efluente tratado
Rotterdan (Holanda)	36	Lodo nitrificante	70	500	Licor amoniacal proveniente da digestão de lodo
Lichtenvoorde (Holanda)	12	Biomassa anammox	100	325	Efluente de curtume
Olburgen (Holanda)	6	Biomassa anammox	600	1.200	Efluente de indústria de alimentos (batata)
Mie Prefecture (Japão)	2	Biomassa anammox	58	220	-
Zurich (Suíça)	6	Biomassa anammox + lodo nitrificante	1.400	625	-
St. Gallen (Suíça)	7	Biomassa anammox + lodo nitrificante	300	108	-
Niederglatt (Suíça)	3	Biomassa anammox	160	56	-
Strass (Áustria)	30	Biomassa anammox + lodo nitrificante	500	250	-
Glarnerland (Suíça)	1,7	Biomassa anammox	400	250	-
Shangai (China)	-	Biomassa anammox	14.000	11.000	Efluente de indústria de alimentos (glutamato)
Ptsea (Reino Unido)	-	Biomassa anammox + lodo nitrificante	240	400	Efluente de aterro industrial
Hattingen (Alemanha)	-	Biomassa anammox	102	102	Efluente de aterro industrial

Fonte: Adaptado de Gao e Tao (2011)

Experimentos utilizando reatores anammox em escala laboratorial, piloto ou plena se mostraram eficientes para o tratamento de diversos tipos de efluentes industriais reais ou sintéticos. O primeiro reator Anammox em escala real obteve sucesso no tratamento de licor amoniacal proveniente de digestor de lodo, conforme discutido anteriormente (VAN DER STAR *et al.*, 2007).

Egli *et al.* (2003) verificaram, em um reator com biodiscos, remoção de amônia por processo anammox de um efluente de aterro sanitário que trata resíduos industriais perigosos, em Kölliken, Suíça. O efluente do aterro possuía 100 a 400 mg.L⁻¹ de Carbono Orgânico Total (COT). Dentre os compostos orgânicos neste efluente pode-se citar os hidrocarbonetos clorados, fenóis e anilina. A concentração de amônia no efluente variava entre 100 a 500 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺. O sistema de tratamento consistia de dois reatores com biodiscos, sendo

que no primeiro havia a remoção de 88% da matéria orgânica presente no despejo. O efluente deste primeiro reator continha essencialmente nitrogênio na forma de amônia, a qual era removida no segundo reator (cerca de 70% de remoção). Esta remoção de amônia no segundo reator foi atribuída ao processo anammox, uma vez que a concentração de carbono orgânico afluente não era suficiente para que o processo de desnitrificação heterotrófica ocorresse. A estrutura da comunidade microbiana no segundo reator foi investigada por meio da técnica de FISH (Hibridação *in situ* fluorescente). Foi observada a presença de bactérias oxidadoras de amônia (*Nitrosomonas* e *Nitrospira*) na zona óxica do biofilme. Nesse ambiente, as bactérias nitrificantes eram responsáveis pela oxidação parcial da amônia a nitrito. Na parte imediatamente inferior, observou-se a presença de bactérias filamentosas (dos grupos *Cytophaga* e *Flavobacterium*), provavelmente auxiliando na estruturação do biofilme. E nas camadas mais inferiores do biofilme, foi confirmada a presença de bactérias anammox (do gênero *Candidatus* “Kuenenia”), provavelmente devido às condições anóxicas presentes. Nesse ambiente, as bactérias anammox eram capazes de oxidar a amônia a nitrogênio gasoso, com o nitrito como aceptor de elétrons. A estrutura do biofilme sugerida pelos referidos autores é apresentada na Figura 3.5.

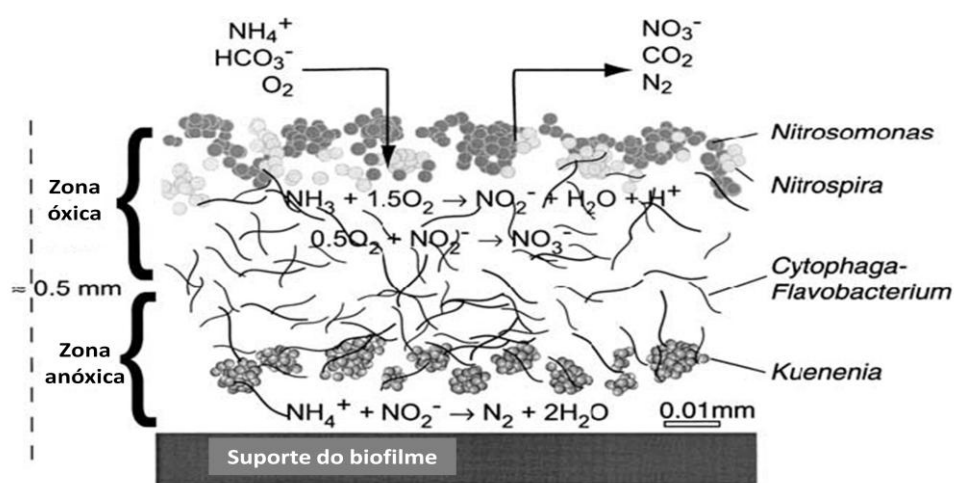


FIGURA 3.5 – Estrutura de biofilme formado em um reator com biodiscos para tratamento de efluente de lixiviado de aterro sanitário.

Fonte: Egli *et al.* (2003)

O processo anammox foi estudado por Toh & Ashbolt (2002) para tratar efluente sintético de coqueria, unidade da indústria siderúrgica, a qual produz despejos com altas concentrações de

amônia e fenol. Os organismos anammox foram capazes de remover nitrogênio do efluente, mesmo na presença de concentrações de fenol de 330 mg.L^{-1} , sendo que a carga de nitrogênio removida alcançou valores máximos de $62 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. Esse estudo demonstrou que o processo anammox tem potencial para ser utilizado na remoção biológica de nitrogênio de efluentes com elevadas concentrações de compostos tóxicos como o fenol.

Molinuevo *et al.* (2009) aplicaram as bactérias anammox em escala laboratorial para o tratamento de efluente de suinocultura. O processo anammox foi estudado para o pós-tratamento deste tipo de efluente, sendo que o mesmo passava primeiramente por dois tipos de reatores distintos: o primeiro era um reator UASB (Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo), no qual o despejo de suinocultura era primeiramente digerido gerando efluentes com valores de DQO iguais a $4,7 \text{ g.L}^{-1}$ e de N-NH_4^+ iguais a $3,78 \text{ g.L}^{-1}$. O segundo promovia a oxidação parcial, tanto de matéria orgânica, quanto de nitrogênio amoniacal, gerando efluentes com valores de DQO iguais a $2,42 \text{ g.L}^{-1}$ e de N-NH_4^+ de $0,67 \text{ g.L}^{-1}$. Os autores verificaram que ambos os reatores tiveram bom desempenho na remoção de amônia, com uma eficiência de 92% para o reator tratando efluente digerido inicialmente no reator UASB e 98% para o reator tratando efluente após a etapa de oxidação parcial. No entanto um aumento nas cargas de DQO aplicadas, em ambos os sistemas, afetaram negativamente a remoção de amônia, inibindo totalmente o processo anammox.

Efluentes de indústrias alimentícias também possuem em sua constituição elevadas concentrações de nitrogênio. Li-Dong *et al.* (2012) investigaram a capacidade da remoção de nitrogênio por processo anammox de um efluente de indústria de glutamato monossódico, um aminoácido extensivamente utilizado no setor alimentício. Os efluentes desse tipo de indústria são caracterizados por possuírem concentrações elevadas de DQO (podendo chegar a 30.000 mg.L^{-1}) e de nitrogênio amoniacal (chegando a 25.000 mg.L^{-1}), culminando, portanto em uma baixa relação Carbono/Nitrogênio (C/N). Isso dificulta a utilização de processos convencionais para a remoção de nitrogênio (nitrificação/desnitrificação, por exemplo). Por esse motivo, também nesse caso, a oxidação anaeróbia da amônia representa uma boa alternativa. Na pesquisa em questão, primeiramente foi realizado o enriquecimento de bactérias anammox a partir de três diferentes lodos de inóculos. Para isso três reatores em escala laboratorial (2 litros de volume) foram utilizados. O efluente industrial a ser tratado em tais reatores continham concentrações de amônia e DQO variando entre $1500\text{-}2000 \text{ mg.L}^{-1}$ e

2000-2500 mg.L⁻¹, respectivamente. No entanto, para este experimento, os despejos foram diluídos cerca de 20 a 30 vezes, ficando com uma concentração em torno de 70 mg.L⁻¹ de amônia. O nitrito foi adicionado ao reator, para possibilitar a oxidação anaeróbia da amônia. Após 360 dias de cultivo, remoção significativa da amônia foi observada nos três reatores avaliados, alcançando aos 420 dias eficiências médias de remoção de N-NH₄⁺ próximas a 70% em ambos os reatores.

O processo anammox também foi estudado recentemente para o tratamento de efluente de indústria farmacêutica na China (TANG *et al.*, 2011a). A referida indústria produz antibióticos de uso veterinário e gera efluentes com elevada concentração de DQO e nitrogênio amoniacal, porém baixa relação C/N. Além disso, os efluentes possuem um caráter tóxico devido à presença de antibióticos e compostos recalcitrantes. Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que quando expostos por período prolongado de tempo a substâncias tóxicas a atividade de bactérias anammox é significativamente inibida, não satisfazendo assim, a exigência de biomassa no sistema para uma eficaz remoção de nitrogênio, levando à deterioração do sistema. No entanto, quando é adicionada biomassa anammox exógena com elevada atividade ao sistema, o mesmo pode se recuperar, melhorando assim, o desempenho da remoção de nitrogênio. Assim, esse estudo desenvolveu um processo, que foi denominado Anammox-SBA (*Anaerobic ammonium oxidation - Sequential biocatalyst*), que consistia de um reator anammox convencional de alta taxa seguido por um biocatalisador sequencial (no qual foi adicionada biomassa anammox granular com elevada atividade). Esse processo, foi capaz de remover uma carga de nitrogênio igual a 9,4 Kg N.m⁻³.d⁻¹ do despejo industrial farmacêutico, gerando um efluente com concentrações menores que 50 mg.L⁻¹, valor que atende aos padrões de lançamento desse poluente para indústrias farmacêuticas na China, local onde o estudo foi conduzido.

Nota-se um crescente interesse na aplicação do processo anammox para o tratamento de efluentes industriais, devido às características únicas desses microrganismos, que conferem a eles grandes vantagens em relação a outros organismos utilizados em técnicas convencionais de tratamento. No entanto, os efluentes industriais geralmente possuem constituição muito complexa, podendo conter ampla variedade de compostos tóxicos, os quais podem inibir o processo anammox. Por isso, o estudo dos compostos que podem exercer um possível efeito inibidor na atividade das bactérias anammox torna-se muito importante, para que se possa

compreender as limitações inerentes a utilização do processo e, com isso, buscar formas de aperfeiçoá-lo a fim de possibilitar sua aplicação em larga escala ao redor do mundo.

3.4 Compostos que exercem efeito tóxico sobre a atividade anammox

Uma variedade de compostos comumente presentes em efluentes, principalmente industriais, podem exercer efeito inibidor sobre o processo anammox. Dentre esses compostos, é possível citar os próprios substratos utilizados por esses microrganismos (amônia e nitrito), em concentrações elevadas, fosfatos, sulfetos, metais pesados, antibióticos, matéria orgânica (glicose, formato, sacarose, propionato) e matéria orgânica tóxica (fenóis, por exemplo) (JIN *et al.*, 2012).

Efluentes industriais como líquido de digestor de lodo, lixiviado de aterros sanitário e de resíduos industriais, efluente de indústria alimentícia, de indústria de produção de fertilizantes, de coqueria, entre outros, contem elevadas concentrações de amônia em sua constituição (VAN DER STAR *et al.*, 2007; EGLI *et al.*, 2003; LI-DONG *et al.*, 2012; TOH & ASHBOLT *et al.*, 2002; JIN *et al.*, 2012). O íon amônio é um dos substratos utilizados pelas bactérias anammox. É por meio da oxidação deste composto que esses microrganismos obtém energia para seu crescimento. É reportado na literatura, que o nitrogênio amoniacal em concentrações elevadas pode inibir a atividade de bactérias anammox. Porém, não há um consenso sobre a faixa de concentração de nitrogênio amoniacal inibitória ao processo anammox.

A inibição por amônia é geralmente atribuída à presença da forma não protonada desse composto (NH_3). Isso porque o íon amônio (NH_4^+) não se difunde com facilidade através da membrana lipídica da célula bacteriana, no entanto a amônia na forma livre pode se difundir mais facilmente (KADAM & BOONE, 1996 *apud* JIN *et al.*, 2012). Em soluções aquosas, há um balanço químico entre as formas de amônia que está intrinsecamente relacionado ao pH do meio (Equação 3.12).



Quando o pH se eleva, o equilíbrio da reação desloca-se para a esquerda, favorecendo a presença de NH_3 (pH=9,5, 50% na forma de NH_3 e 50% na forma de NH_4^+ ; pH>11,

praticamente toda amônia na forma de NH_3). Quando o pH está em torno da neutralidade, praticamente toda a amônia está na forma de NH_4^+ (VON SPERLING, 2005). Dessa forma, quando o pH intra e extracelular são diferentes, as concentrações de amônia intra e extracelulares também são diferentes. Assim, haverá a formação de um gradiente de concentração que irá conduzir a difusão de formas não ionizadas de amônia para dentro da célula. Isso fará com que haja uma mudança no pH intracelular, neutralizando o potencial de membrana da célula bacteriana, podendo levar à morte da mesma (MARTINELLE *et al.*, 1996). Um dos fatores que pode controlar a inibição por amônia em reatores anammox, portanto, seria o controle cuidadoso do pH, que deve ser mantido entre 6,7 e 8,3, faixa ótima para o crescimento desses microrganismos (STROUS *et al.*, 1999b).

Dapena-Mora *et al.* (2007) verificou que quando uma cultura de bactérias anammox foi submetida a uma concentração de N-NH_4^+ igual a 770 mg.L^{-1} a atividade anammox foi inibida em 50%, no entanto a inibição foi atribuída à forma não ionizada desse composto (NH_3). Fernández *et al.* (2012) investigaram os efeitos da exposição de bactérias anammox à amônia a curto (testes realizados em frascos em batelada) e a longo prazo (testes em um reator em batelada sequencial). Os resultados obtidos nos testes realizados a curto prazo evidenciaram inibição da atividade quando a concentração de amônia na forma livre foi igual a $38 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$. Já nos testes a longo prazo, obteve-se uma instabilidade da performance do RBS quando a concentração de N-NH_3 atingiu valores de 25 mg.L^{-1} , sendo que a remoção de amônia foi totalmente inibida quando a concentração chegou a $35\text{-}40 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$. Carvajal-Arroyo *et al.* (2013) investigaram a inibição por NH_4^+ sob biomassa anammox cultivada na forma granular e suspensa e os resultados obtidos demonstraram que concentração igual a 44 mM (660 mg.L^{-1}) causaram inibição de 16% e 34%, na biomassa granular e em suspensão, respectivamente.

A inibição do processo anammox por nitrito (NO_2^-) também tem sido estudada. O nitrito é um substrato utilizado pelas bactérias que oxidam a amônia anaerobiamente, servindo como acceptor final de elétrons na reação. Vários estudos reportam que a concentração de nitrito é crítica para a estabilidade do processo anammox e, assim como no caso do substrato amônia, as concentrações inibitórias encontradas nos diferentes estudos são bastante variáveis, de acordo com as diferentes condições experimentais e modos de operação dos reatores anammox (JIN *et al.*, 2012). Segundo Zhu *et al.* (2008) as concentrações inibitórias de nitrito

variam em função da espécie de bactéria cultivada e das características da biomassa (se cresce dispersa ou em forma de grânulos), do tipo de reator, do tipo de alimentação e das condições físico-químicas oferecidas ao processo. Strous *et al.* (1999b), estudando a fisiologia das bactérias anammox em um RBS verificaram que concentrações de NO_2^- acima de 100 mg.L^{-1} inibiram completamente o processo, no entanto, a atividade foi recuperada após a adição de intermediários da reação anammox (hidroxilamina e hidrazina) ao reator. Uma concentração inibitória maior foi encontrada por Egli *et al.* (2001), os quais encontraram valores iguais a 185 mg.L^{-1} de N-NO_2^- inibindo completamente a atividade anammox. Dapena-Mora *et al.* (2007), em estudos utilizando frascos em batelada verificaram que 50% da atividade anammox foi perdida quando essas bactérias foram submetidas à concentrações de nitrogênio nitroso iguais a 350 mg.L^{-1} . Concentrações de NO_2^- iguais a $10,8 \text{ mM}$ ($496,8 \text{ mg.L}^{-1}$) e $13,2 \text{ mM}$ ($607,2 \text{ mg.L}^{-1}$) foram requeridas para inibir 50% da atividade de biomassa anammox cultivada em suspensão e na forma granular, respectivamente, em estudos conduzidos por Carvajal-Arroyo *et al.* (2013). Neste estudo, concentrações acima de $15,1 \text{ mM}$ (690 mg.L^{-1}) deste composto inibiram completamente o processo.

A inibição do processo anammox por nitrito é associada não ao íon nitrito (NO_2^-) propriamente dito, mas ao ácido nitroso (HNO_2^-). Como no caso da amônia, o pH também afeta o equilíbrio $\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2^-$ em um meio líquido. Para que se alcance o sucesso durante a utilização do processo anammox, portanto, a concentração de HNO_2^- também deve ser controlada por meio do controle do pH (JIN *et al.*, 2012). Fernández *et al.* (2012) investigaram os efeitos da exposição a curto e longo prazo do nitrito sobre a atividade anammox, porém em termos de ácido nitroso livre (medindo a concentração de N-HNO_2^-). No experimento, em que foi utilizado um RBS, concentrações acima de $1,5 \mu\text{g}$ de $\text{N-HNO}_2^-.\text{L}^{-1}$ causou a perda da eficiência na remoção de amônia e a desestabilização do sistema. No entanto, quando a concentração de N-HNO_2^- voltou a ser igual a $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ houve a recuperação do sistema.

Os fosfatos e os sulfetos são compostos inorgânicos que também podem inibir a reação anammox. No caso dos fosfatos, foi observada inibição de 50% da atividade anammox sob concentrações iguais a 20mM ($1,9 \text{ g.L}^{-1}$). Vale ressaltar que essa concentração é maior, do que as comumente encontradas em efluentes industriais (DAPENA-MORA *et al.*, 2007). Não obstante, já foi observada inibição completa do processo anammox em concentrações mais

baixas de fosfato, 5 mM (475 mg.L⁻¹) (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996). No caso dos sulfetos, concentrações entre 1 e 2 mM (96-192 mg.L⁻¹) causam inibição de 60% na atividade anammox, e quando alcançam 5 mM (480 mg.L⁻¹) são capazes de inibir totalmente o processo (DAPENA-MORA *et al.*, 2007).

Os metais pesados podem se acumular nos organismos, causando efeitos tóxicos nos mesmos. Alguns tipos de efluentes industriais, como os lixiviados de aterros sanitários e industriais possuem metais pesados em sua constituição, por esse motivo, uma compreensão mais clara acerca da inibição de bactérias anammox por esses compostos poderia auxiliar no tratamento desse tipo de efluentes utilizando esses microrganismos. Van de Graaf *et al.* (1995) verificaram que concentrações iguais a 271 mg.L⁻¹ de HgCl₂ foram capazes de inibir completamente o processo anammox. As concentrações inibitórias do cobre (Cu) ao processo anammox também já foram testadas experimentalmente e os resultados demonstraram que 36% da atividade anammox é perdida quando essas bactérias são submetidas à concentração de cobre igual a 10 mg.L⁻¹ (YANG & JIN, 2012). No entanto, os estudos com esse tema, ainda são raros na literatura.

O efeito de alguns antibióticos na inibição do processo anammox também já foi investigado. Os antibióticos são extensivamente aplicados para o tratamento de doenças humanas e animais e podem ser encontrados nos ambientes aquáticos como águas superficiais e subterrâneas e em estações de tratamento de efluentes. Em estudo conduzido por Van de Graaf *et al.* (1995) foram adicionados em reatores anammox os antibióticos Penicilina (100 mg.L⁻¹), Cloranfenicol (200 mg.L⁻¹) e Ampicilina (800 mg.L⁻¹), os quais foram capazes de promover a inibição de 36%, 98% e 94% da atividade anammox, respectivamente. A oxitetraciclina, bastante utilizada para o tratamento de doenças em suínos, e portanto, presente em efluentes de suinocultura, também foi investigada e verificou-se que concentrações de 500 mg.L⁻¹ foi capaz de inibir 37% da remoção de amônia por processo anammox (YANG & JIN, 2012).

Compostos orgânicos estão presentes em praticamente todos os tipos de efluentes, e comprovadamente promovem efeitos adversos à atividade de microrganismos anammox (GÜVEN *et al.*, 2005; CHAMCHOI *et al.*, 2008; MOLINUEVO *et al.*, 2009). Güven *et al.* (2005) observou inibição completa e irreversível da atividade anammox por metanol em concentrações tão baixas quanto 0,5 mM. Chamchoi *et al.* (2008) investigando

simultaneamente a ocorrência de reação anammox e desnitrificação em reatores do tipo UASB, verificaram que o aumento gradativo da concentração de DQO inibiu gradualmente a atividade de bactérias anammox, favorecendo concomitantemente a atividade de bactérias desnitrificantes. Observou-se, nesse estudo que concentrações de DQO acima de 300 mg.L⁻¹ são capazes de inibir totalmente a reação anammox. Resultados semelhantes foram obtidos por Molinuevo *et al.* (2009), no qual efluentes de suinocultura com concentrações de DQO variando de 237 mg.L⁻¹ a 290 mg.L⁻¹ inibiram a remoção de amônia em reatores anammox, aumentando a atividade de organismos desnitrificantes.

Sabe-se que a inibição do processo anammox por matéria orgânica pode ocorrer devido à inativação enzimática, podendo ser irreversível, levando à morte celular (GÜVEN *et al.*, 2005). Outro mecanismo proposto é a competição pelo acceptor de elétrons (nitrito) entre bactérias anammox, que são autotróficas, e bactérias heterotróficas desnitrificantes. Ou seja, para que o composto orgânico possa ser oxidado por bactérias desnitrificantes em condições anóxicas, o íon nitrito, será consumido por esses microrganismos. Como as bactérias heterotróficas são capazes de crescer mais rapidamente em relação às autotróficas, acabam por eliminar as bactérias anammox na competição, inibindo dessa maneira, sua atividade (CHANCHOI *et al.*, 2008; GÜVEN *et al.*, 2005; MOLINUEVO *et al.*, 2009; LACKNER *et al.*, 2008).

Dentre os compostos orgânicos existem aqueles possuem toxicidade elevada e são de difícil biodegradabilidade, como por exemplo, os fenóis (JIN *et al.*, 2012). O fenol é tóxico aos microrganismos, uma vez que é capaz de romper a membrana lipídica da célula bacteriana, conduzindo à morte celular (VAN SCHIE & YONG, 2000 *apud* OMENA, 2008). Vários tipos de efluentes industriais contem concentrações expressivas de fenóis em sua constituição. Esses compostos são frequentemente encontrados em efluentes da indústria de celulose e têxtil, indústria petroquímica e refinarias de petróleo, indústria farmacêutica e em efluentes das unidades de coqueria da indústria siderúrgica (JIN *et al.*, 2012; TOH & ASHBOLT, 2002; COLLINS *et al.*, 2005). A inibição do processo anammox por fenóis é tratada com maiores detalhes no item 3.5 do presente trabalho.

A Tabela 3.4 apresenta, resumidamente, as concentrações inibitórias de alguns compostos já estudados sobre a atividade de bactérias anammox.

TABELA 3.4 – Concentrações inibitórias de alguns compostos sobre a atividade anammox

Composto	Concentração (ng.L-1)	Efeito	Referência
N-NO ₂ ⁻	100	Inibição completa	Strous <i>et al.</i> (1999b)
N-NO ₂ ⁻	185	Inibição completa	Egli <i>et al.</i> (2001)
N-NO ₂ ⁻	350	Inibição 50% de atividade	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2007)
N-NO ₂ ⁻	274	Inibição	Kimura <i>et al.</i> (2010)
N-NO ₂ ⁻	280	Inibição	Isaka <i>et al.</i> (2007)
NO ₂ ⁻	690	Inibição completa	Carvajal-Arroyo <i>et al.</i> (2013)
N-NH ₄ ⁺	770	Inibição de 50% da atividade	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2007)
NH ₄ ⁺	660	Inibição de 16 a 34% da atividade	Carvajal-Arroyo <i>et al.</i> (2013)
N-NH ₃	35-40	Inibição	Fernández <i>et al.</i> (2012)
Fosfatos	1900	Inibição de 50% da atividade	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2007)
Fosfatos	475	Inibição	Van de Graaf <i>et al.</i> (1996)
Sulfetos	96-192	Inibição de 60% da atividade	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2007)
HgCl ₂	271	Inibição	Van de Graaf <i>et al.</i> (1995)
Cobre (Cu)	10	Inibição de 36% de atividade	Yang & Jin (2012)
H ₂ S	0,34-1,02	Inibição de 50% da atividade	Carvajal-Arroyo <i>et al.</i> (2013)
Penicilina	100	Inibição de 36% da atividade	Van de Graaf <i>et al.</i> (1995)
Cloranfenicol	200	Inibição de 98% da atividade	Van de Graaf <i>et al.</i> (1995)
Ampicilina	800	Inibição de 94% da atividade	Van de Graaf <i>et al.</i> (1995)
Oxitetraciclina	500	Inibição de 37% da atividade	Yang & Jin (2012)
Metanol	1,6	Inibição completa	Güven <i>et al.</i> (2005)
DQO	300	Inibição	Chamchoi <i>et al.</i> (2008)
DQO	237-290	Inibição	Molinuevo <i>et al.</i> (2009)
Fenol	50-550	Inibição	Toh & Ashbolt (2002)

3.5 Inibição do processo anammox por fenóis

O fenol é também conhecido como ácido carboxílico, hidroxibenzeno, ácido fênico, oxibenzeno, ácido fenílico, benzenol ou álcool fenílico. Este composto forma cristais translúcidos em forma de agulha quando está em sua forma pura e torna-se rosa ou vermelho quando impurezas estão presentes. Sua fórmula molecular é C₆H₆O e sua estrutura química é apresentada na Figura 3.5 (NCBI, 2013; <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary>).

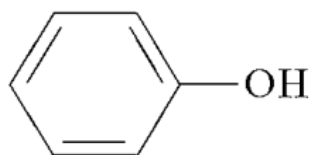


FIGURA 3.6 – Fórmula estrutural do fenol

Os fenóis constituem uma importante classe de contaminantes ambientais pela sua presença em muitos tipos de efluentes industriais (refinarias, indústrias petroquímicas, indústrias siderúrgicas – coquearias, entre outros). Embora seja biodegradável por via aeróbia e anaeróbia, o fenol é tóxico para a maioria dos microrganismos, principalmente para os não aclimatados, sendo que até mesmo baixas concentrações, iguais a 10 mg.L^{-1} é capaz de causar inibição. Ademais, o fenol pode ser tóxico até mesmo para microrganismos que o utilizam como substrato, podendo causar sérios problemas em estações de tratamento de efluentes (PASSOS *et al.*, 2009).

Os estudos sobre a inativação do processo anammox por compostos orgânicos tóxicos como os fenóis são ainda escassos na literatura. Toh & Ashbolt (2002), enriqueceram com sucesso bactérias anammox a partir de lodo ativado de estação de tratamento de esgotos municipal e adaptaram a cultura a um efluente sintético de coquearia com concentrações crescentes de fenol. A concentração de fenol foi gradualmente aumentada de 50 mg.L^{-1} até 550 mg.L^{-1} e a atividade anammox foi inibida em vários momentos durante o experimento de adaptação, o que foi evidenciado pelo aumento do consumo de nitrito em relação à amônia, que era próximo a 1:1,1 inicialmente e chegou a 1:3,0 em alguns momentos, indicando que o consumo de nitrito estava acontecendo por outras vias, que não a anammox. A atividade das bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia foi sendo recuperada, à medida que a cultura foi se adaptando ao fenol, voltando a remover amônia e nitrito em proporções próximas às da reação anammox. Ao final do experimento, concluiu-se que o consórcio enriquecido foi capaz de remover uma carga de N-NH_4^+ igual a $62 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, mesmo sob concentração de fenol igual a 330 mg.L^{-1} . Esse estudo demonstrou que o processo anammox tem potencial para ser utilizado na remoção biológica de nitrogênio de efluentes com elevadas concentrações de compostos orgânicos tóxicos como o fenol. Entretanto, foi necessária uma adaptação a longo prazo da cultura microbiana ao efluente contendo fenol.

Estudo realizado por Yang & Jin (2012) avaliou o efeito inibitório conjunto de fenol mais sulfeto e fenol mais cobre sobre culturas de bactérias anammox. Os autores concluíram que o efeito do fenol em conjunto com o sulfeto é sinérgico, ou seja, a soma dos efeitos individuais dos dois inibidores foi menor do que o efeito combinado dos mesmos. Já no caso da combinação fenol mais cobre, observou-se que a inibição foi dependente do fenol: quando a concentração de fenol foi igual a 300 mg.L^{-1} , ocorreu um efeito antagonista, ou seja, o efeito inibitório dos dois compostos em conjunto foi menor que a soma dos efeitos individuais dos dois compostos testados; quando a concentração de fenol foi igual a 75 mg.L^{-1} , houve efeito sinérgico. Esse estudo foi importante, uma vez que alguns tipos de efluentes, como os da indústria petroquímica possuem fenóis e sulfetos em sua constituição, assim como efluentes de coqueria de indústrias siderúrgicas possuem fenóis e cobre. Dessa forma, a investigação de como os compostos tóxicos em conjunto influenciam a atividade de bactérias anammox é importante quando se pensa na aplicação deste processo para a remoção de nitrogênio desses efluentes industriais.

Yang *et al.* (2013) realizaram um estudo sobre o efeito do fenol sobre a atividade anammox a curto prazo (utilizando testes em batelada) e a longo prazo (utilizando reator UASB contendo biomassa granular anammox). Esse estudo permitiu a observação das mudanças ocorridas nos grânulos anammox sob estresse devido ao fenol e, ainda, foram estudadas as estratégias de controle para recuperação da eficiência do processo após a supressão da atividade anammox devido à exposição ao fenol. No experimento realizado a curto prazo, utilizando frascos em batelada, foram inoculadas concentrações de fenol variando de 0 a 850 mg.L^{-1} . Observou-se que a remoção de N-NO_2^- , N-NH_4^+ e nitrogênio total decresceu gradualmente, à medida que a concentração de fenol aumentou, sendo que houve perda de 50% da atividade anammox quando a concentração de fenol atingiu $678,2 \text{ mg.L}^{-1}$.

Nos testes realizados a longo prazo, em que fenol foi aplicado a um reator UASB contendo biomassa granular anammox, foi possível observar que 50 mg.L^{-1} de fenol foi suficiente para desestabilizar o reator. Após 11 dias de exposição a essa concentração de fenol, a carga de nitrogênio removida, a qual era de $13,9 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ antes da exposição a esse composto, decresceu para $1,5 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, correspondendo a uma redução na remoção de nitrogênio igual a 89,2%. Com intuito de aclimatar os microrganismos ao fenol, a concentração desse composto foi reduzida no reator e, aos 87 dias de operação, quando a concentração de fenol

era igual a $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$, o desempenho do reator na remoção de nitrogênio foi recuperada, alcançando cargas de nitrogênio removidas iguais a $12,7 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Após essa recuperação, a concentração de fenol foi novamente aumentada para 50 mg.L^{-1} , e dessa vez, houve redução da eficiência de remoção de nitrogênio, porém em níveis muito menores, de apenas 6,3%, ou seja, a carga de nitrogênio removida diminuiu para $11,9 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Isto demonstrou que um longo período de aclimação sob baixas concentrações de fenol pode aumentar a tolerância de bactérias anammox a esse composto (Yang *et al.*, 2013).

Outro aspecto estudado por Yang *et al.* (2013) foi a alteração das características da biomassa granular anammox após o estresse devido à exposição ao fenol. Os autores reportaram que o fenol alterou as propriedades de sedimentação do lodo, sendo que a biomassa contida no reator alimentado com fenol (R1) apresentou menor velocidade de sedimentação (v_s) em relação ao reator controle (R2; não alimentado com fenol). Observou-se também uma maior quantidade de lodo saindo com o efluente no R1. Os autores reportaram que isso pode ter ocorrido devido à lise de células, e também devido à maior fragilidade da estrutura dos grânulos presentes neste reator, que foram facilmente fragmentados, e tiveram suas v_s diminuídas em decorrência do estresse pela alimentação com fenol.

Apesar da grande importância de trabalhos que avaliem o efeito do fenol sobre processo anammox, uma vez que esses compostos se encontram presentes em vários tipos de efluentes industriais, as investigações acerca desse tema ainda são raras. Além disso, ainda não foi reportado qual o efeito desse composto na comunidade microbiana desenvolvida em reatores com atividade anammox. Esse tipo de estudo pode contribuir para otimizar a aplicação do processo anammox no tratamento de efluentes que contenham fenóis e nitrogênio amoniacal em elevadas concentrações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Operação do reator em batelada sequencial (RBS)

4.1.1 Características e modo de operação do RBS

O enriquecimento e cultivo de bactérias anammox foram realizados em um reator de mistura completa operado em bateladas sequenciais. O RBS era de vidro, possuía volume total de 3 L e volume de trabalho de 2 L, sendo equipado com sondas de temperatura, oxigênio dissolvido, sondas de nível e pH (*Benchtop Fermentor & Bioreactor BioFlo[®]/CelliGen[®] 115, New Brunswick*). Nas Figuras 4.1 e 4.2 encontram-se, respectivamente, a representação esquemática e uma foto do reator utilizado no presente estudo.

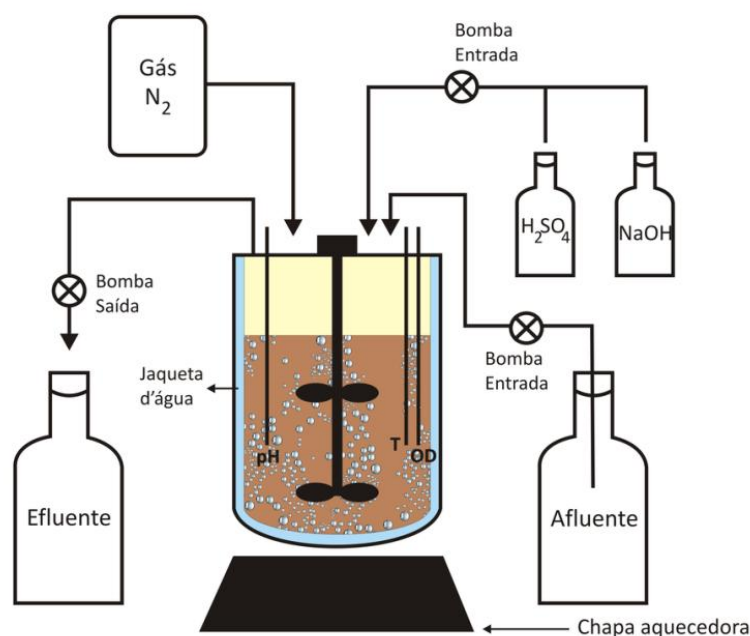


FIGURA 4.1 – Representação esquemática do RBS utilizado para o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox. (pH) Sensor de pH; (T) Sensor de Temperatura; (OD) Sensor de oxigênio dissolvido



FIGURA 4.2 – RBS utilizado para o enriquecimento e cultivo de bactérias anammox

A temperatura no interior do reator foi mantida a 35 °C e o pH permaneceu em torno de 7,5. O pH era ajustado sempre que necessário utilizando soluções de NaOH (0,5M) e H₂SO₄ (1M). O reator era protegido da luz para evitar o crescimento de algas, as quais podem competir com as bactérias anammox pelo nitrogênio do meio. Ao RBS foi acoplada uma bolsa de gás contendo nitrogênio a fim de manter a anaerobiose no interior do reator. Sempre que necessário gás nitrogênio era adicionado no interior do líquido e no *headspace* do reator.

O reator foi monitorado durante um período de 423 dias (dezembro de 2011 a janeiro de 2013). Foram definidos dois ciclos diários de operação do reator, um curto (oito horas) e um longo (dezesesseis horas) e essa condição foi mantida durante a maior parte do experimento. Cada ciclo foi dividido em quatro etapas: (i) período de sedimentação, onde a agitação era interrompida para que a biomassa pudesse sedimentar; (ii) período de retirada de meio, em que o efluente do reator era retirado e coletado; (iii) período de alimentação, onde o meio afluente era bombeado para dentro do reator e a agitação era restabelecida; (iv) período de reação, que consistiu no tempo em que a biomassa permaneceu reagindo com o meio afluente sob agitação contínua. A duração de cada período variou ao longo do experimento, entretanto, na Figura 4.3 é apresentado um diagrama evidenciando a duração da cada período que predominou na maior parte do experimento.

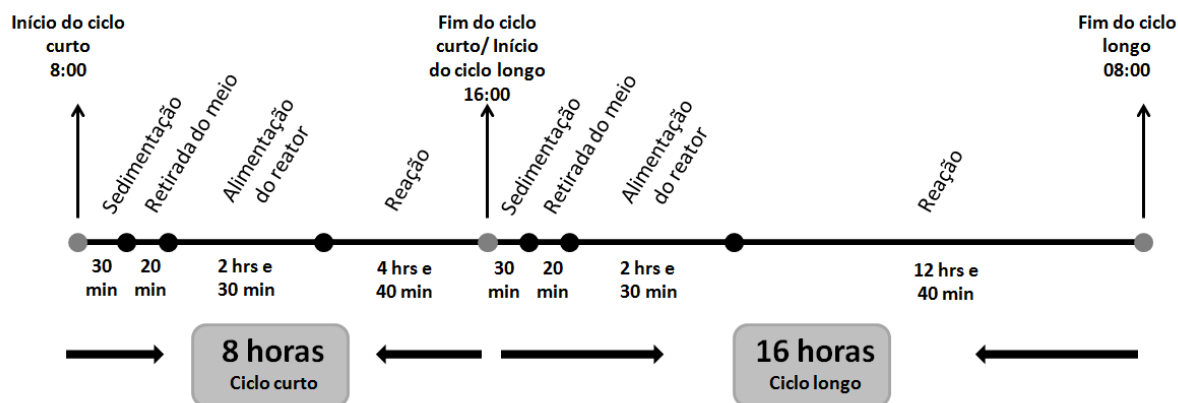


FIGURA 4.3 – Diagrama dos ciclos de operação do RBS evidenciando a duração de cada período predominante na maior parte do experimento

Ao longo do experimento foram testados diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH) no RBS, conforme especificado na Tabela 4.1. No 90º dia de operação do reator, quando o TDH era de 44 horas, observou-se o início da atividade anammox. Por esse motivo, esse TDH foi mantido até 290 dias. Posteriormente, com intuito de aumentar a carga de nitrogênio aplicada ao reator, sem alterar a concentração de nitrito e amônia afluente, o TDH foi diminuído para 24 horas, sendo que essa condição permaneceu até o final do experimento.

TABELA 4.1 – Tempos de detenção hidráulica do RBS ao longo do tempo de operação

Dias de operação	TDH (horas)
1-13	48
14-85	40
86-290	44
291-423	24

4.1.2 Inóculo

O lodo utilizado como inóculo para o enriquecimento de bactérias anammox foi proveniente de um sistema de lodos ativados convencional da Estação de Tratamento de Esgotos do Ribeirão Arrudas (ETE Arrudas) operada pela Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA). A ETE Arrudas trata os esgotos sanitários de Belo Horizonte-MG, e de parte da cidade de Contagem-MG, atendendo a uma população equivalente a um milhão de habitantes (<http://www.copasa.com.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=31>).

A escolha do inóculo foi baseada em estudo previamente realizado por Araújo *et al.* (2011), em que foi obtido sucesso no enriquecimento de bactérias anammox em reator em batelada sequencial a partir de amostras derivadas do mesmo sistema de lodos ativados da ETE Arrudas. O lodo de inóculo foi coletado na linha de recirculação dos decantadores secundários, os quais compõem o sistema de lodos ativados convencional da estação.

Foram coletados aproximadamente cinco litros de lodo e transportados até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde uma alíquota foi retirada para análise de Sólidos Totais Voláteis (STV), segundo metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Outra alíquota do lodo foi coletada e preservada para a caracterização microbiológica por meio de técnicas de biologia molecular.

Quatro litros de lodo, com concentração de $3,1 \text{ g STV.L}^{-1}$ foram centrifugados a 4.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento remanescente foi adicionado a um frasco tipo *shot* contendo dois litros de meio de cultura autotrófico utilizado para o enriquecimento de bactérias anammox, que será detalhado no item 4.1.3. Porém os substratos amônia e nitrito não foram adicionados a esse meio. Isso resultou em uma concentração final inoculada de $6,2 \text{ g STV.L}^{-1}$ de meio de cultura anammox.

4.1.3 Meio de cultura utilizado no enriquecimento de bactérias anammox

Para o enriquecimento e cultivo das bactérias anammox foi utilizado um meio de cultura mineral e autotrófico (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996; DAPENA-MORA *et al.*, 2004). O meio de cultura continha amônia e nitrito como únicos doador e acceptor de elétrons, respectivamente. Carbonato foi usado como única fonte de carbono. A composição completa do meio de cultura encontra-se detalhada nas Tabelas 4.2 e 4.3.

TABELA 4.2 – Composição do meio mineral autotrófico

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
NH ₄ Cl	Variável
NaNO ₂	Variável
KHCO ₃	0,5
KH ₂ PO ₄	0,027
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,18
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
Solução de micronutrientes I	1,0 mL
Solução de micronutrientes II	1,25 mL

Fonte: Dapena-Mora (2004) e Van de Graaf (1996)

TABELA 4.3 – Composição das soluções de micronutrientes

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹) para a solução I	Concentração (g.L ⁻¹) para a solução II
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	6,25	15,0
FeSO ₄	6,25	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	0,43
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0,24
MnCl ₂ .4H ₂ O	-	0,99
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	0,25
NaMoO ₄ .2H ₂ O	-	0,22
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	0,19
Na ₂ SeO ₃	-	0,08
H ₃ BO ₄	-	0,014

Fonte: Dapena-Mora (2004)

As concentrações iniciais de N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺ afluentes foram de aproximadamente 20 mg.L⁻¹. Após a identificação de atividade anammox no RBS, com consumo simultâneo desses compostos na proporção estequiométrica da reação anammox (1,32 mol de N-NO₂⁻: 1 mol de N-NH₄⁺), as concentrações de amônia e nitrito foram aumentadas gradativamente. A concentração de nitrito máxima afluente ao RBS foi próxima de 160 mg.L⁻¹ e a de amônia 170 mg.L⁻¹, quando observou-se perda de eficiência na remoção de nitrogênio. Por esse motivo as concentrações afluentes foram reduzidas para valores próximos a 90 mg.L⁻¹ de nitrito e amônio até o final do experimento, conforme será apresentado e discutido no item Resultados e Discussão.

Ao meio de cultura era adicionado gás nitrogênio a fim de expulsar o oxigênio dissolvido e propiciar condições anaeróbias no interior do frasco. O nitrogênio era adicionado durante 15 minutos no interior do meio e 5 minutos no *headspace* do frasco. O pH do meio de cultura era sempre ajustado, com soluções de NaOH (0,5M) e H₂SO₄ (1M), para que ficasse entre 7,2 e 7,8.

4.1.4 Avaliação do efeito de concentrações crescentes de fenol no processo anammox

A partir do 336º dia de operação iniciou-se a adição de fenol ao reator a fim de avaliar se esse composto exerceria algum efeito tóxico sobre o processo e a atividade das bactérias anammox. O fenol era adicionado com auxílio de seringas de 60 mL de volume por meio de um septo localizado na parte superior do RBS durante o ciclo longo. Volumes variáveis de uma solução concentrada de fenol (1 g.L^{-1}) eram adicionados para que as concentrações finais desejadas no interior do reator fossem alcançadas. As concentrações iniciais de fenol no interior do reator foram iguais a 10 mg.L^{-1} e semanalmente, estas concentrações foram sendo aumentadas, de acordo com as informações descritas na Tabela 4.4.

TABELA 4.4 – Concentrações de fenol inoculadas no RBS durante o experimento de alimentação com fenol.

Semana	Dias de operação	Concentração de fenol no interior do RBS (mg.L^{-1})	Volume da solução de fenol concentrada (1 g.L^{-1}) adicionado ao RBS (mL)
1	336-342	10	20
2	343-349	25	50
3	350-356	50	100
4	357-363	100	200
5	364-370	200	300
6	371-377	300	600

Ao final do ciclo longo de operação do RBS uma alíquota do efluente era coletada e eram analisados os parâmetros N-NO_2^- e N-NH_4^+ , bem como a relação de consumo $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$, a fim de avaliar se estava ocorrendo alterações tanto na eficiência de remoção de nitrogênio quanto na razão estequiométrica de consumo de nitrito /amônia característica do processo anammox.

Para avaliar se as diferentes concentrações de fenol testadas tiveram algum efeito significativo na eficiência do processo e se houve alteração da razão estequiométrica de consumo de nitrito/amônia, foi aplicado o teste *Kruskal-Wallis* para comparação entre medianas ($\alpha=5\%$), seguido de teste de comparação múltipla entre medianas ($\alpha=5\%$), para os casos em que houve diferença significativa entre as medianas no teste *Kruskal-Wallis*. Para isso utilizou-se o *software Statistica 8*.

Considerou-se como controle (referência da remoção de nitrogênio pelo processo anammox no RBS) um período de operação precedente à alimentação com fenol (291 até 335 dias), em que a concentração afluyente deste composto era nula. Este período foi considerado para a comparação realizada, porque nele prevaleceram condições de operação semelhantes às utilizadas durante o período de alimentação do reator com fenol. As condições operacionais do RBS durante os testes de alimentação com fenol consistiram de concentrações afluentes de amônio e nitrito próximas a 90 mg.L^{-1} e 118 mg.L^{-1} , respectivamente, temperatura igual a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, agitação igual a 70 rpm e TDH igual a 24 horas.

Após a sexta semana de alimentação do reator com fenol, observou-se diminuição da atividade anammox no RBS e, por esse motivo, optou-se por interromper a alimentação com este composto para que a cultura de bactérias não fosse inibida de maneira irreversível (como discutido no item Resultados e Discussão).

4.2 Análises físico-químicas

4.2.1 Análise de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) no lodo de inóculo

A análise de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) do lodo utilizado como inóculo seguiu a metodologia do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). As análises foram realizadas em triplicata e considerou-se como resultado final a média entre as mesmas.

4.2.2 Determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+)

As concentrações de nitrogênio amoniacal foram determinadas no afluyente e efluente do RBS por meio do método colorimétrico $4500 \text{ NH}_3\text{F}$ descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), com modificações. Este método baseia-se na formação de um composto de coloração azul intensa, denominado indofenol, proveniente da reação da amônia, hipoclorito e fenol, catalisada por nitroprussiato de sódio.

As análises de nitrogênio amoniacal foram realizadas diariamente (cinco vezes por semana) até o 90º dia de operação do reator, quando teve início a atividade anammox. Posteriormente, esta análise passou a ser realizada com frequência de três vezes por semana. As determinações

foram feitas em triplicata e realizava-se a média entre as repetições para obtenção do resultado final.

O procedimento consistiu inicialmente na transferência de 5 mL da amostra (ou de diluição da amostra) em tubos tipo Falcon de 15 mL e de 5 mL de água MilliQ[®] (constituindo o branco) em tubos semelhantes. Posteriormente pipetou-se 200 µL de solução de fenol 1% (p/v) e em sequência, 200 µL de uma solução de nitroprussiato de sódio 0,5% (p/v), agitando bem a mistura. Finalmente adicionou-se 500 µL de uma solução oxidante, preparada a partir de hipoclorito de sódio 4-6% e de uma solução alcalina (constituída de citrato de sódio e hidróxido de sódio) na proporção 2:1. Os tubos eram fechados e homogeneizados em agitador tipo vórtex e incubados à temperatura ambiente na ausência de luz por um período de duas horas. Após a incubação seguiu a etapa de leitura em espectrofotômetro (HACH DR, 2800) à absorvância de 630 nm, com cubeta redonda de vidro.

A concentração era obtida por meio da equação da reta gerada durante a construção da curva de calibração do método (Equação 4.1) considerando $R^2 > 0,99$, preparada mensalmente, com soluções padrão contendo concentrações conhecidas de nitrogênio amoniacal.

$$Y = aX + b \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde, Y= Absorvância;

X= Concentração.

4.2.3 Determinação da concentração de nitrogênio na forma de nitrito (N-NO₂⁻)

As concentrações de nitrogênio nitroso foram determinadas no afluente e efluente do RBS por meio do método colorimétrico 4500 NO₂⁻ B, segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), com modificações. O método baseia-se na reação do nitrito com ácido sulfanílico, sob condições de baixo pH para formar um íon diazônico, o qual se acopla com um composto α -Naftil, formando um corante de coloração avermelhada.

As determinações de nitrito foram realizadas na mesma frequência das determinações de amônia, no entanto, foram realizadas em duplicata, sendo o resultado final obtido por meio da obtenção da média entre as replicatas.

Para a execução da análise de nitrogênio nitroso, pipetou-se 5 mL da amostra (ou de diluições das amostras) em tubos tipo Falcon de 15 mL e também 5 mL de água MilliQ® (branco). Seguidamente, pipetou-se 200 µL do reagente de cor (composto por ácido fosfórico 85%, sulfanilamida e cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina). Os tubos foram tampados e a mistura homogeneizada em vórtex. Incubaram-se os tubos a temperatura ambiente por 20 minutos. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (HACH DR, 2800) a 543 nm, utilizando cubeta quadrada de caminho óptico igual a 1 cm.

A concentração de nitrogênio na forma de nitrito foi obtida por meio de equação da reta (Equação 4.2) gerada durante a curva de calibração do método ($R^2 > 0,999$), a qual era realizada mensalmente, utilizando soluções padrão com concentrações conhecidas de $N-NO_2^-$.

$$Y = aX + b \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Onde, Y= Absorbância;

X= Concentração.

4.2.4 Determinação das concentrações de nitrato (NO_3^-)

A determinação das concentrações de nitrato no efluente do RBS foi realizada por meio de cromatografia de troca iônica utilizando-se o método 4110 B, conforme descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). A frequência das análises foi de três vezes por semana e foram analisadas as amostras coletadas a partir de 110 dias de operação do RBS.

As amostras foram filtradas em filtro Millipore® com poro de 45 µm e diluídas em água MilliQ® de modo que as concentrações de nitrato permanecessem dentro da curva de calibração do método. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Análises Instrumentais do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, onde as análises foram realizadas em cromatógrafo iônico DIONEX ICS 1000, com coluna de guarda Ion Pac AG22

2x50 mm, coluna analítica Ion Pac AS22 2x250 mm, supressora ASRS300 2 mm, detector de condutividade DS6 e injetor automático (DIONEX AS-DV). Como fase móvel utilizou-se uma solução 4,5 mmol/L de Na₂CO₃ e 1,75 mmol/L de NaHCO₃ a uma vazão de 0,25 mL.min⁻¹.

Os resultados das concentrações dos íons nitrato (NO₃⁻) obtidos foram transformados em concentração de nitrogênio na forma de nitrato (N-NO₃⁻) por meio da equação 4.3. Essa transformação teve como objetivo possibilitar o cálculo da relação estequiométrica produção de N-NO₃⁻: consumo de N-NH₄⁺, obtida no experimento, a fim de comparar com dados reportados na literatura para a reação anammox.

$$\text{Concentração de N-NO}_3^- = \frac{\text{massa (g) do N} \times \text{Concentração de NO}_3^-}{\text{Massa (g) do NO}_3^-} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

4.3 Análises microbiológicas

Amostras do inóculo e da biomassa enriquecida no RBS após 110, 190, 270, 330 e 370 dias de operação foram coletadas para caracterização microbiológica por meio de técnicas de biologia molecular. As coletas das amostras de biomassa do RBS foram realizadas por meio de um coletor localizado na parte superior do reator, a coleta foi realizada durante o período de reação, quando a biomassa e o meio líquido encontravam-se sob agitação contínua. Após a coleta, as amostras foram submetidas à centrifugação a 4000 rpm por 20 minutos e lavadas por três vezes sucessivas com tampão fosfato para posterior utilização nas análises moleculares. A Figura 4.4 apresenta um fluxograma da metodologia utilizada para a caracterização microbiológica das amostras do inóculo e do RBS.

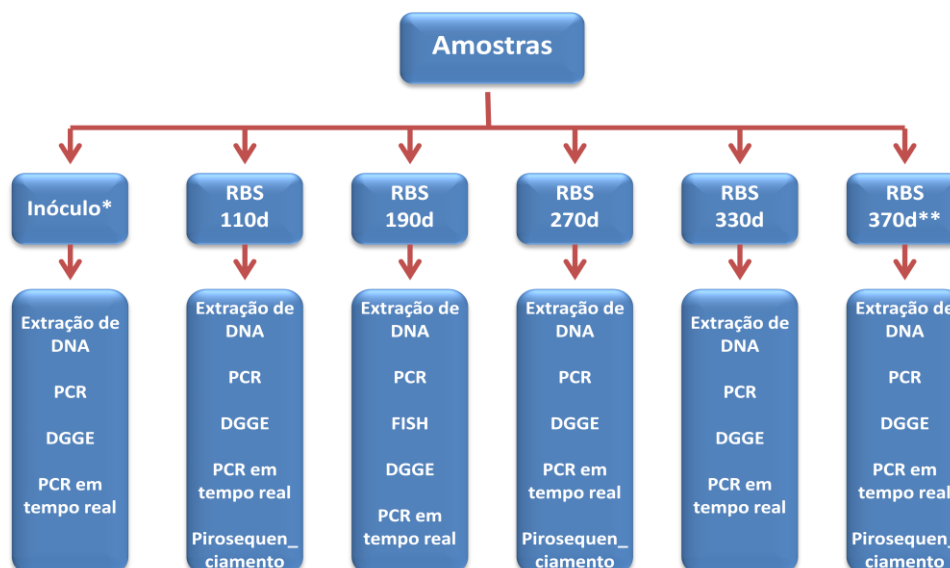


FIGURA 4.4 – Fluxograma das metodologias utilizadas para a caracterização microbiológica das amostras do inóculo e da biomassa cultivada no RBS. (*) O inóculo corresponde ao tempo zero de operação do RBS; (**) Amostra coletada após 34 dias do início da adição de fenol ao RBS.

Na Tabela 4.5 são apresentadas as condições operacionais do reator no momento das coletas de biomassa para a realização das análises microbiológicas.

TABELA 4.5 – Condições operacionais no RBS no momento das coletas de biomassa realizadas para análises de biologia molecular

Coleta da biomassa (dias de operação do RBS)	Concentração aproximada de N-NO_2^-	Concentração aproximada de N-NH_4^+	TDH do reator	Alimentação com fenol
110	30	30	44	Não
190	100	132	44	Não
270	90	118,8	44	Não
330	90	118,8	24	Não
370	90	118,8	24	Sim

4.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras do inóculo e da biomassa enriquecida no RBS seguiram a metodologia descrita por Egli *et al.* (2003), com adaptações. Pesou-se 0,25 grama de cada amostra em microtubo com tampa de rosca, onde foi adicionado 0,2 grama de pérolas de vidro e 1,2 mL de tampão TEN (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA pH 8,0; 0,1 M NaCl). A mistura foi levada ao microdesmembrador sob agitação máxima por 1 minuto. Posteriormente, deixou-se a amostra em banho de gelo por um minuto e repetiu-se o procedimento. A amostra sedimentou por 5 minutos à temperatura ambiente para separação das pérolas de vidro.

O sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo, no qual foi adicionado um volume de fenol tamponado com Tris-HCl e um volume de solução de clorofórmio- álcool isoamílico. Agitou-se a amostra em homogeneizador tipo vórtex e centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo. Adicionou-se novamente um volume de clorofórmio- álcool isoamílico e a amostra foi novamente agitada e centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foi adicionada à amostra 10% do volume da amostra de solução de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e o mesmo volume da amostra de isopropanol gelado. A amostra foi homogeneizada cuidadosamente e foi incubada em freezer a -20 °C por um período de 12 horas para que o DNA precipitasse.

Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Subsequentemente, adicionou-se 300 µL de etanol 70% a fim de lavar o DNA e retirar os sais. A amostra foi novamente centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e a amostra foi incubada a temperatura ambiente mantendo a tampa do microtubo aberta para que todo o etanol fosse evaporado, a fim de secar o DNA. Por fim, o DNA foi ressuscitado em 150 µL de água ultrapura estéril, previamente aquecida a 70 °C.

Alíquotas de 2 µL dos DNAs extraídos foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, a 100 V por 25 minutos para verificar a integridade do DNA. As concentrações das amostras de DNA extraídas foram estimadas através de um espectrofotômetro NanoDrop

ND1000 (*Thermo Scientific*), sendo obtidas também as razões de pureza 280/260 nm e 260/230 nm. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C para posterior utilização nas técnicas de biologia molecular utilizadas no presente trabalho.

4.3.2 Detecção de bactérias anammox pela PCR

Para a detecção e confirmação da presença de bactérias anammox nas amostras do inóculo e da biomassa enriquecida no RBS foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a extração de DNA, segundo protocolo proposto por Egli *et al.* (2003), os DNAs das amostras em estudo foram amplificados por PCR utilizando iniciadores específicos para microrganismos do grupo Planctomicetos e para bactérias anammox (Tabela 4.6).

TABELA 4.6 – Iniciadores utilizados nas reações da PCR para detecção de bactérias anammox.

Iniciadores	Especificidade	Sequência (5'→3')	Referência
Pla46f	RNAr 16S de Planctomicetos	GGATTAGGCATGCAAGTC	Schmid <i>et al.</i> (2000)
Amx820r	RNAr 16S dos Gêneros “ <i>Brocadia e Kuenenia</i> ”	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	Schmid <i>et al.</i> (2000)
HzsA526f	Gene da hidrazina sintase de bactérias anammox	TAYTTTGAAGGDGACTGG	Harhangi <i>et al.</i> (2012)
HzsA1857r	Gene da hidrazina sintase de bactérias anammox	AAABGGYGAATCATARTGGC	Harhangi <i>et al.</i> (2012)

As concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR estão descritas na Tabela 4.7.

TABELA 4.7 – Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR

Reagente	Concentração da solução estoque	Concentração final por reação	Volume para reação de 25 μ L (μ L)
H ₂ O ultrapura estéril	-	-	19,1
Tampão de PCR	10x	1x	2,5
dNTPs	25mM	200 μ M	0,2
Iniciador 1	30 pmol/ μ L	300 nM	0,25
Iniciador 2	30 pmol/ μ L	300 nM	0,25
Albumina de soro bovina (BSA)	5 ng/ μ L	0,3 ng/ μ L	1,5
Taq polimerase	5 U/ μ L	0,04 U/ μ L	0,2
DNA	Variável	variável	1

As condições de amplificação para o par de iniciadores Pla46f-Amx820r consistiram de uma etapa inicial de desnaturação por 4 minutos a 94 °C, trinta e cinco ciclos que compreenderam 45 segundos de desnaturação a 94 °C, 50 segundos de anelamento a 56 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C. Por fim, uma etapa de extensão por 7 minutos a 72 °C.

Para os iniciadores HzsA526f-HzsA1857r as condições de amplificação utilizadas foram: etapa inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minuto, trinta ciclos que compreenderam desnaturação a 96 °C por 1 minuto, anelamento a 54 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1,5 minuto, extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Após a eletroforese o gel foi observado em transiluminador de luz UV (*UVP products*) e as imagens obtidas por um sistema de captura de imagens. Foi utilizado o marcador de peso molecular *GeneRuler Express DNA Ladder 100-5000 pb (Thermo Scientific)* (Figura 4.5).

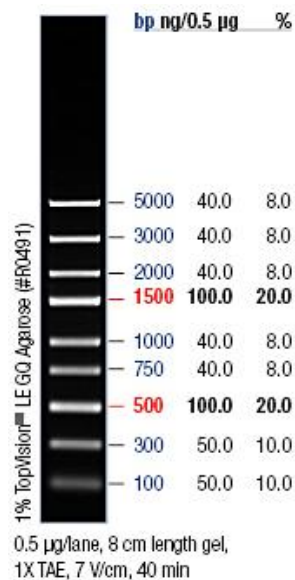


FIGURA 4.5 – Marcador de peso molecular *GeneRuler Express DNA Ladder* 100-5000 pb.

4.3.3 Detecção de bactérias anammox pela técnica de FISH

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) também foi utilizada para a detecção de bactérias anammox no RBS aos 190 dias de operação do reator, de acordo com a metodologia descrita por Amann *et al.* (1995). Utilizou-se a sonda de oligonucleotídeo Amx-820 (5'AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC 3'), específica para os gêneros *Candidatus* “Brocadia” e “Kuenenia” (Schimid *et al.*, 2000).

As amostras foram primeiramente fixadas em tampão de paraformaldeído 4%. A fixação proporciona a criação de poros na membrana da célula permitindo posteriormente a entrada da sonda na mesma. Além disso, a etapa de fixação das células é importante para manter a morfologia e a estrutura fisiológica celular intacta, conservando dessa forma, a quantidade de RNAr original no citoplasma da célula. Assim, a célula pode ser identificada durante a observação ao microscópio.

Após a fixação, seguiu a etapa de montagem da lâmina. Foi pipetado 1 µL da amostra espalhando a gota sobre a superfície vítrea da lâmina cuidadosamente. A lâmina foi incubada por cerca de 30 minutos em estufa a 46 °C e posteriormente passou por processo de desidratação por meio de banhos em soluções com concentrações crescentes de etanol (50, 80 e 100% - volume/volume).

Em seguida foi iniciado o processo de hibridação com a sonda Amx-820. Nessa etapa, ocorre a entrada da sonda na célula e a ligação da mesma ao RNAr, com sequência de nucleotídeos complementar à da sonda, presente no citoplasma celular. Foi adicionada sobre a amostra fixada na lâmina 9 µL microlitros de tampão de hibridação (NaCl, 5M; solução de EDTA, 0,5M; Tris-HCl, 1M; SDS 50%; 35% de formamida) e 1 µL da sonda (50 ng/µL). A lâmina foi colocada em uma câmara úmida e incubada em estufa a 46 °C durante 2 horas. Após a hibridação, a lâmina foi lavada em tampão de lavagem (EDTA, 0,5M; SDS 20%; Tris-HCl 1M; 80 mM de NaCl) por 20 minutos em banho maria à temperatura de 48 °C, para retirar os sais presentes no tampão de hibridação.

As células fixadas na lâmina foram então coradas com DAPI (4-diamino-2-fenilindol). O DAPI é um corante que intercala no DNA das células corando-as sem nenhuma especificidade. Foram adicionados sobre cada amostra fixada na lâmina 9 µL de água destilada e 1 µL de DAPI, com concentração igual a (20 ng/µL). A lâmina foi incubada protegida da luz à temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente foi mergulhada rapidamente em água destilada para retirar o excesso de corante DAPI. Após completa secagem da lâmina foram adicionados 5 µL de solução de PBS e glicerol sobre cada amostra fixada na lâmina e a mesma foi coberta por uma lamínula.

Por fim, a lâmina foi observada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX-50) em objetiva de imersão. Foram utilizados filtros específicos com espectro de absorção entre 510 a 550 nm e de 330 a 385 nm para captação de emissões de fluorescência proveniente da sonda e do corante DAPI, respectivamente.

4.3.4 Análise do perfil da comunidade microbiana pela técnica de PCR-DGGE

Para a análise do perfil da comunidade microbiana ao longo do tempo de operação do RBS utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase seguida por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993). O DNA das amostras analisadas foi extraído utilizando o método de Egli *et al.* (2003) conforme detalhado no item 4.3.1.

Foi realizada a PCR com os iniciadores 1055f e 1392r-GC para o RNAr 16S do domínio *Bacteria* (Tabela 4.7). As condições de amplificação para estes iniciadores consistiram de desnaturação inicial por 1 minuto a 94 °C. Trinta ciclos, sendo os dez primeiros ciclos com 5

minutos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento (com temperaturas reduzindo de 53 °C a 43 °C, com redução de 1 °C por ciclo) e 3 minutos de extensão a 72 °C. Os vinte ciclos posteriores consistiram de 5 minutos de extensão a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 43 °C e 3 minutos de extensão a 72 °C.

Os produtos da PCR foram primeiramente analisados por eletroforese em gel de agarose 2% e quantificados por meio da comparação com o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) (Figura 4.6). Para a quantificação dos produtos utilizou-se o processador de imagens *ImageJ* 1.6.0.

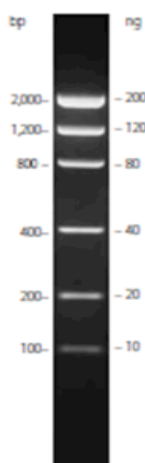


FIGURA 4.6 – Marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*.

Subsequentemente, 500 ng do produto da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (massa/volume), com gradiente desnaturante de ureia e formamida variando de 45% a 75%. O gel foi preparado a partir de soluções estoques com 0% e 100% de uréia e formamida. Para a polimerização do gel foram utilizadas soluções de persulfato de amônio (APS) 10% (volume/volume) e tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,1% (volume/volume). A eletroforese foi realizada em tampão tris acetato EDTA (TAE) 0,5X em voltagem constante de 80 V durante 17 horas. Após a corrida, o gel foi corado durante 30 minutos em solução do corante SYBR[®] *gold* (Invitrogen) (30 µL de corante 10.000X em 300 µL de tampão TAE 0,5X). O gel foi observado em transiluminador de luz UV (*UVP products*) e sua imagem obtida por um sistema de captura de imagem.

O perfil obtido no gel de DGGE foi analisado no *software* BioNumerics 2.5 (*Applied Maths*). O coeficiente de similaridade foi determinado utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson* e o dendrograma foi construído utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*).

As bandas mais predominantes nos perfis do gel de DGGE foram recortadas e reamplificadas por PCR utilizando o par de iniciadores 1055f e 1392r (Tabela 4.8), com as mesmas condições de amplificação citadas anteriormente para este par de iniciadores. Os produtos da PCR obtidos foram enviados para a empresa Macrogen (Coréia) para realização do sequenciamento, o qual foi realizado em sequenciador 3730XL. As sequencias obtidas foram comparadas com aquelas presentes no *GenBank* utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

TABELA 4.8 – Iniciadores utilizados na reação da PCR para a técnica PCR-DGGE

Iniciadores	Especificidade	Sequência (5'→3')	Referência
1055f	Região v8 do RNAr 16S de domínio <i>Bacteria</i>	ATGGCTGTCGTCAGCT	Ferris <i>et al.</i> (1996)
1392r-GC	Região v8 do RNAr 16S de domínio <i>Bacteria</i>	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCG CCGCCCCCGCCCCACGGGCGGTGTGTAC	Ferris <i>et al.</i> (1996)
1392r	Região v8 do RNAr 16S de domínio <i>Bacteria</i>	ACGGGCGGTGTGTAC	Ferris <i>et al.</i> (1996)

4.3.5 Quantificação de bactérias anammox por meio de PCR em tempo real

O número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox e bactérias totais foi estimado por PCR em tempo real no inóculo e nas amostras de biomassa provenientes do RBS. A técnica da PCR em tempo real combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. Este método é capaz de quantificar o DNA de maneira mais precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina os valores na fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado Ciclo de *Threshold* (C_T), e o mesmo permite a quantificação exata e reprodutível de acordo com a fluorescência emitida. Um composto fluorescente amplamente utilizado em reações de PCR em tempo real é o SYBR[®] *Green*, o qual se liga na fita dupla de DNA e emite fluorescência. A intensidade da fluorescência é proporcional à

quantidade de produto gerado na reação de PCR. As etapas metodológicas utilizadas para a quantificação de bactérias nas amostras do RBS estão descritas nos itens seguintes.

4.3.5.1 Obtenção dos plasmídeos recombinantes para as curvas padrão de DNA

Para curvas padrão de DNA utilizou-se plasmídeos recombinantes contendo os genes RNAr 16S de bactérias e RNAr 16S de anammox, que já se encontravam disponíveis no laboratório, uma vez que foram obtidos em pesquisas anteriormente realizadas por Mac Conell (2012) de acordo com a metodologia descrita a seguir.

Os plasmídeos para a quantificação do gene RNAr 16S de bactérias em geral foram obtidos utilizando uma cultura pura de *Pseudomonas aeuroginosa* (ATCC 27853), cedida pelo Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG. Para quantificação do gene RNAr 16S de bactérias anammox utilizou-se DNA genômico proveniente de biomassa cultivada em reatores de enriquecimento anammox, obtida a partir de experimentos prévios conduzidos no Laboratório de Microbiologia do DESA. Os DNAs das culturas de *P. aeuroginosa* e da biomassa anammox foram extraídos e realizou-se reação de PCR com iniciadores específicos para bactérias em geral e anammox, respectivamente. Os produtos de PCR foram clonados em vetor plasmidial (kit *pGem Easy Vector*, Promega) e inseridos em células *E. coli* JM 109, seguindo instruções do fabricante.

As colônias de interesse, que continham o plasmídeo recombinante foram repicadas em placas de petri contendo ágar Luria Bertani (LB) estéril com auxílio de palitos estéreis. Para confirmar o sucesso da clonagem, as colônias repicadas foram submetidas à nova reação de PCR com os iniciadores específicos para os microrganismos de interesse. Em caso de resultado positivo, as colônias repicadas que obtiveram crescimento satisfatório em placa contendo ágar LB foram coletadas e preservadas em 1 mL de caldo LB estéril (suplementado com 10% de glicerol) a -80 °C.

Para extração do DNA plasmidial, os clones recombinantes foram repicados em 3 mL de caldo LB estéril e incubados por um período de 16 a 24 horas a 35°C . Posteriormente, realizou-se a extração dos plasmídeos utilizando o kit *Illustra Plasmid Prep Mini Spin* (GE Healthcare Life Sciences) conforme as instruções do fabricante. Por fim, o DNA plasmidial

(plasmídeo + inserto) foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*) e a partir do resultado obtido, calculou-se a massa do inserto de acordo com as etapas seguintes:

- a) Primeiramente, calculou-se o número de cópias do plasmídeo + inserto por meio da Equação 4.4, considerando que a massa de 1 mol de par de base (pb) possui 660g e que o número de moléculas em 1 mol é igual a $6,02 \times 10^{23}$ (WHELAN *et al.*, 2003).

$$\text{Cópias de DNA} = \frac{6,02 \times 10^{23} \text{ (cópias/mol)} \times \text{quantidade de DNA (ng)}}{\text{Tamanho do DNA (pb)} \times 6,6 \times 10^{11} \text{ (ng/mol/pb)}} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

- b) Sabendo o número de cópias do plasmídeo + inserto, sabe-se o número de cópias do inserto e dessa forma, pode-se calcular a quantidade de DNA do inserto utilizando a mesma Equação 4.6, substituindo o tamanho do plasmídeo + inserto, pelo tamanho do inserto.

Após a estimativa da quantidade em nanogramas de DNA do inserto foram realizadas diluições sucessivas do DNA plasmídial em água ultrapura nas proporções 1:5 e 1:10 para bactérias em geral e bactérias anammox, respectivamente. A Tabela 4.9 detalha algumas informações referentes ao tamanho dos plasmídeos, insertos e das faixas de valores esperados do número de cópias para as curvas padrão utilizadas na análise de PCR em tempo real.

TABELA 4.9 - Valores esperados para o número de cópias de DNA das curvas padrão dos ensaios de quantificação absoluta pela PCR em tempo real

Microrganismos investigados	Iniciadores	Tamanho do inserto (pb)	Tamanho do plasmídeo + inserto (pb)	Massa de 1 mol do plasmídeo + inserto (ng)	Massa de 1 mol do inserto (ng)	Nº de cópias esperado na curva padrão
Bactérias em geral	1055F/ 1392R	337	3352	$2,21 \times 10^{15}$	$2,22 \times 10^{14}$	$8,5 \times 10^7$ a $2,7 \times 10^4$
Bactérias anammox	Pla46F/ Amx667R	621	3636	$2,4 \times 10^{15}$	$4,1 \times 10^{14}$	$3,5 \times 10^5$ a $3,5 \times 10^0$

4.3.5.2 Preparo das reações para a realização da PCR em tempo real

Para as reações de PCR em tempo real utilizou-se o mix *Maxima™ SYBR Green/ ROX q PCR Master Mix 2X* (Fermentas). Os reagentes utilizados na reação e suas respectivas concentrações estão detalhados na Tabela 4.10. O volume final de cada reação foi igual a 20

μL. As reações foram realizadas em triplicata, tanto para as amostras, quanto para os controles negativos e diluições das curvas padrão.

TABELA 4.10 – Concentração dos reagentes utilizados na PCR em tempo real

Reagentes	Concentração do estoque	Concentração final por 20 μL de reação	Volume por reação (μL)
Água ultrapura	-	-	7,5
Master Mix ⁽¹⁾	2X	1X	10,0
Iniciador <i>Foward</i>	30 pmol/μL	375nM	0,25
Iniciador <i>Reverse</i>	30 pmol/μL	375nM	0,25
Amostra de DNA	variável	0,5 ng/ μL	2,0

(1) O Master mix inclui o tampão da PCR, MgCl₂, a enzima *Taq* polimerase *Hot start*, dNTP, o corante *SYBR Green I* e o corante de referência passiva ROX.

Um termociclador em tempo real modelo *Applied Biosystem 7500* foi utilizado nesta análise. Os pares de iniciadores utilizados estão detalhados na Tabela 4.11 e o programa consistia de 40 ciclos de desnaturação por 1 minuto (94 °C), anelamento dos iniciadores por 1 minuto (temperatura de acordo com par, conforme especificado na Tabela 4.11) e extensão por 1 minuto (72 °C). O programa se encerrava com a elaboração da curva de *melting* ou de dissociação, que é útil para checar a pureza dos produtos amplificados. Esta etapa consistia de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95 °C e 15 segundos a 60 °C.

TABELA 4.11 – Iniciadores utilizados nas reações da PCR em tempo real

Par de iniciadores	Sequência 5'→3'	Gene alvo	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
1055F 1392R	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGGCGGTGTGTAC	Região V8 do RNAr 16S de bactérias	53	Ferris <i>et al.</i> (1996)
Pla 46F Amx 667R	GGATTAGGCATGCAAGTC ACCAGAAGTTCCACTCTC	RNAr 16S de bactérias anammox	56	Van der Star <i>et al.</i> (2007)

4.3.5.3 Estimativa do número de cópias de RNAr 16S em cada amostra

Para o cálculo do número de cópias dos genes por reação utilizou-se as equações da reta obtidas a partir das curvas padrão. A Tabela 4.12 apresenta as equações das curvas padrão e eficiências obtidas nos ensaios da PCR em tempo real realizados no presente estudo.

TABELA 4.12 – Equações de reta das curvas padrão obtidas nos ensaios da PCR em tempo real

Grupo alvo	Par de iniciadores	Eficiência da reação (%)	r^2	Valor do <i>Threshold</i>	Equação da Reta
Bactérias em geral	1055F/1392R	101,20	1	0,151544	$Y = -3,292x + 7,702$
Bactérias anammox	Pla46F/Amx667R	98,99	0,997	0,074873	$Y = -3,346x + 6,1$

Por meio da equação da reta, obteve-se a quantidade em nanogramas de DNA das amostras investigadas e, por meio da Equação 4.4, determinou-se o número de cópias de DNA por reação, ou o número de cópias do gene por 10 ng de DNA (quantidade de DNA adicionada em cada reação). Posteriormente, estimou-se a quantidade em nanogramas de DNA extraído por grama de lodo e dessa maneira, por regra de três simples, calculou-se o número de cópias de genes por grama de lodo.

4.3.6 Análise da diversidade microbiana pela técnica de pirosequenciamento

A técnica de pirosequenciamento foi utilizada para análise da diversidade microbiana da biomassa cultivada após 270 dias no RBS. As amostras coletadas nos dias 110 e 370 dias também foram enviadas para análise, porém os resultados não encontravam-se disponíveis quando da conclusão deste trabalho. Por isso, são apresentados somente os resultados referentes à amostra coletada do RBS aos 270 dias de operação. O pirosequenciamento, particularmente o sistema 454 *Life Sciences*, que foi utilizado no presente trabalho, tem como princípio o mesmo do sequenciamento *Sanger*, envolvendo a síntese de uma fita complementar pela DNA polimerase. No entanto, no pirosequenciamento, cada vez que ocorre a incorporação de um nucleotídeo à fita complementar, uma molécula de pirofosfato é liberada, fornecendo a energia necessária para a liberação de luz, pela enzima luciferase, a qual também é incorporada ao sistema. Dessa forma, quando a sequência em análise incorpora uma base gera um pico de luz, o qual sinaliza que esta sequência incorporou uma base complementar àquela presente no sítio de inserção. Pelas regras do pareamento de bases,

consegue-se revelar a identidade do nucleotídeo naquele sítio da amostra de DNA (MADIGAN *et al.*, 2010).

Inicialmente o DNA das amostras foi extraído de acordo com Egli *et al.* (2003) e purificado utilizando o kit de purificação *Wizard[®] Genomic DNA Purification kit* (Promega). A quantidade de DNA foi estimada utilizando espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*). Foram utilizadas amostras de DNA com concentração acima de 50 ng/μL e com grau de pureza OD 260/280 igual ou superior a 1,8. O DNA foi desidratado com etanol 95% e enviado para o Instituto de Agrobiologia Rosario (INDEAR), Argentina, onde foi realizada a análise de pirosequenciamento em equipamento 454 GS-FLX (*Life Sciences*, Roche). Utilizou-se um *barcode* com 10 pb (TGTACTACTC), um iniciador *foward* (CACGACGTTGTAAAACGACAYTGGGYDTAAAGNG), sendo que a esta sequência foi incorporado o *tag* e um iniciador *reverse* (CAGGAAACAGCTATGACC). O par de iniciadores utilizados (563f-802r) tem como alvo uma região variável do gene que codifica o RNAr 16S de bactérias em geral (região v4).

O software QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*; CAPORASO *et al.*, 2010) foi utilizado para a análise dos dados obtidos no pirosequenciamento, a qual também foi realizada pela INDEAR. Primeiramente, as sequências foram filtradas de acordo com as etapas seguintes:

- a) Foram descartadas as sequências com tamanho menor que 200 pb e aquelas que possuíam qualidade inferior a 25.
- b) Das sequências restantes, foram extraídas apenas aquelas que possuíam o *barcode* especificado anteriormente, com uma tolerância de até 2 pb de erro. Uma vez identificado o *barcode*, o mesmo foi removido.
- c) Nas sequências selecionadas na etapa anterior, identificou-se a sequência correspondente ao tag + iniciador *foward*, tolerando um erro de até 3 pb e a sequência foi removida.
- d) Buscou-se também o iniciador *reverse*, removendo-o. Caso o iniciador *reverse* não fosse encontrado, removeu-se apenas o *tag*.
- e) Por fim, foram removidos as sequências que possuíam homopolímeros maiores ou iguais a 6 e também as sequências que apresentaram ao menos uma base ambígua.

Uma vez selecionadas as sequências, partiu-se para o agrupamento das mesmas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). A definição das UTOs foi realizada pelo método *Uclust* (EDGAR, 2010), com 97% de similaridade. Posteriormente foram selecionadas as sequências representativas de cada UTO por meio do *software* QIIME e as UTOs foram classificadas utilizando a base de dados *RDP-classifier* (Ribossomal Database Project; <http://rdp.cme.msu.edu/>), adotando o limite de confiança igual a 0,95.

Foram calculadas as medidas de diversidade alfa da amostra (dominância, equitabilidade e índice Shannon). Os índices de dominância e equitabilidade foram calculados por meio do *software* QIIME e o índice Shannon foi determinado utilizando a ferramenta *RDP-Pyrosequencing Pipeline* (<http://pyro.cme.msu.edu>). Além disso, foram quantificadas as UTOs com uma e duas sequências (UTOs simples e duplas).

A árvore filogenética foi construída para as sequências representativas das UTOs relacionadas a bactérias anammox. Utilizou-se o *software* *Mega* versão 4.0 e o método *Neighbor Joining*. As distâncias evolutivas foram calculadas usando método *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA *et al.*, 2004). Análises de *bootstrap* contendo 1.000 réplicas foram realizadas para verificar e estimar a confiabilidade e o arranjo da árvore filogenética.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Dinâmica dos compostos nitrogenados no RBS*

Nas Figuras 5.1 e 5.2 são apresentados os resultados das concentrações afluentes e efluentes de N-NH_4^+ e N-NO_2^- durante os dois ciclos de operação do reator, 16 horas e 8 horas, respectivamente, ao longo dos 423 dias de operação. A Figura 5.3 apresenta a produção de N-NO_3^- , e conseqüentemente, a liberação deste composto no efluente do RBS ao longo do tempo. Com base nos resultados obtidos e para uma melhor compreensão dos mesmos, os perfis de consumo de amônio e nitrito e produção de nitrato foram divididos em três fases, as quais foram denominadas: fase I – fase inicial, na qual predominou o processo de desnitrificação; fase II – fase de propagação de bactérias anammox, em que houve uma diminuição da atividade desnitrificante e; fase III – fase anammox, onde predominou o processo de oxidação anaeróbia da amônia. Ao final da fase III foram realizados testes de alimentação do RBS com concentrações crescentes de fenol, a fim de avaliar se esse composto seria capaz de interferir na remoção de nitrogênio pelas bactérias anammox. Entretanto, neste item serão discutidos os resultados referentes ao período em que o reator foi alimentado com meio afluente autotrófico (0 a 335 dias). O experimento de alimentação do reator com fenol é discutido no item 5.2.

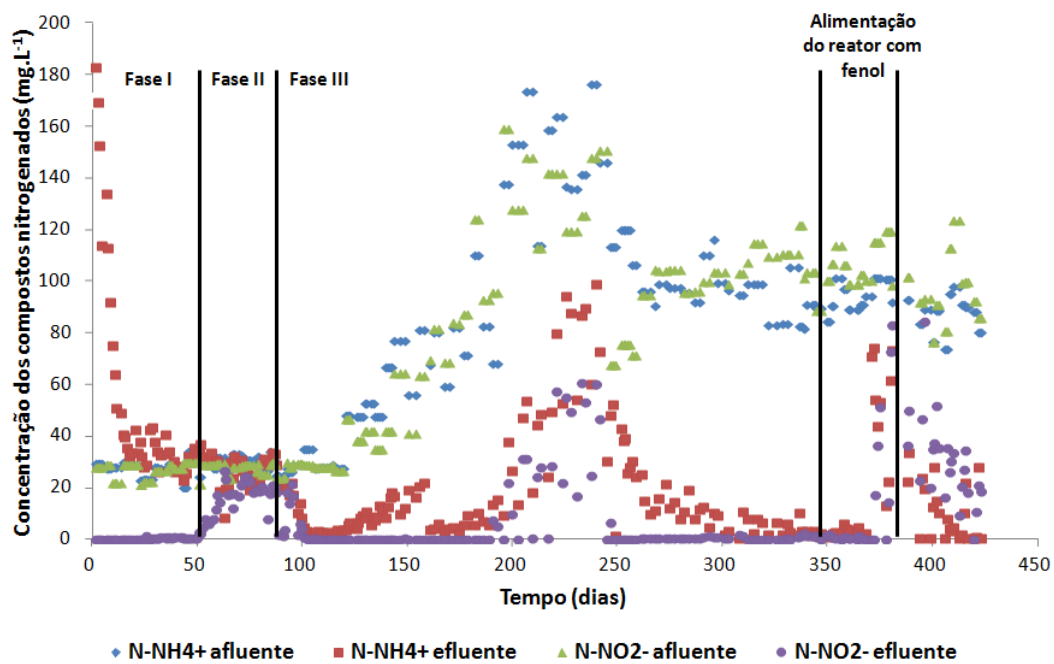


FIGURA 5.1 – Dinâmica dos compostos nitrogenados no RBS ao longo do tempo de operação – ciclo longo (16 horas)

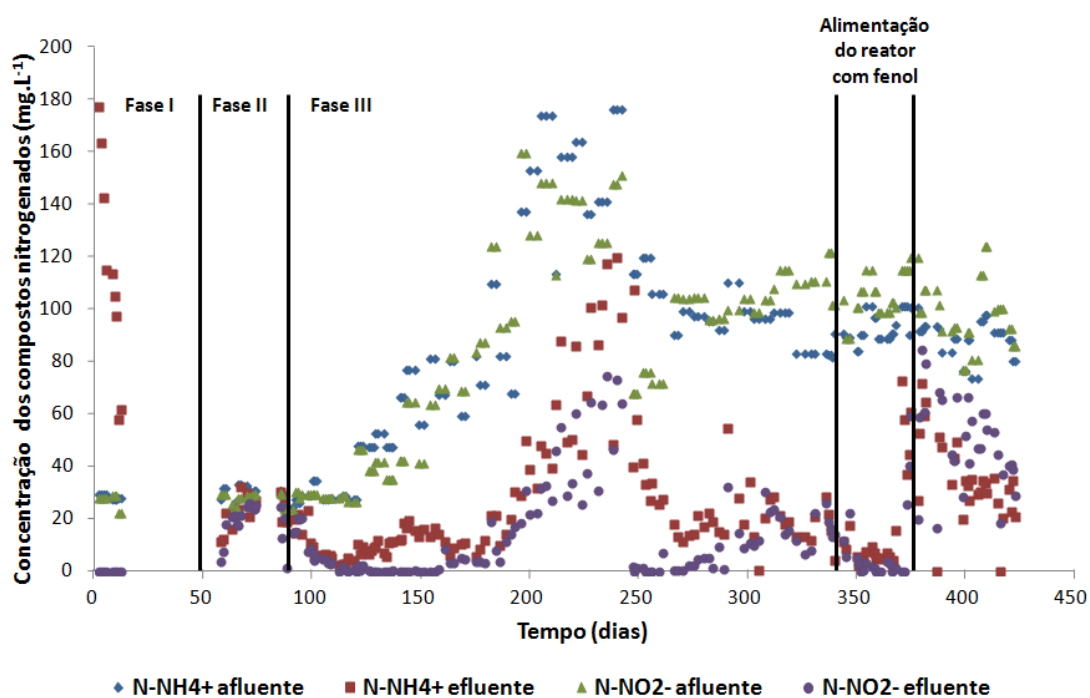


FIGURA 5.2 – Dinâmica dos compostos nitrogenados no RBS ao longo do tempo de operação – ciclo curto (8 horas)

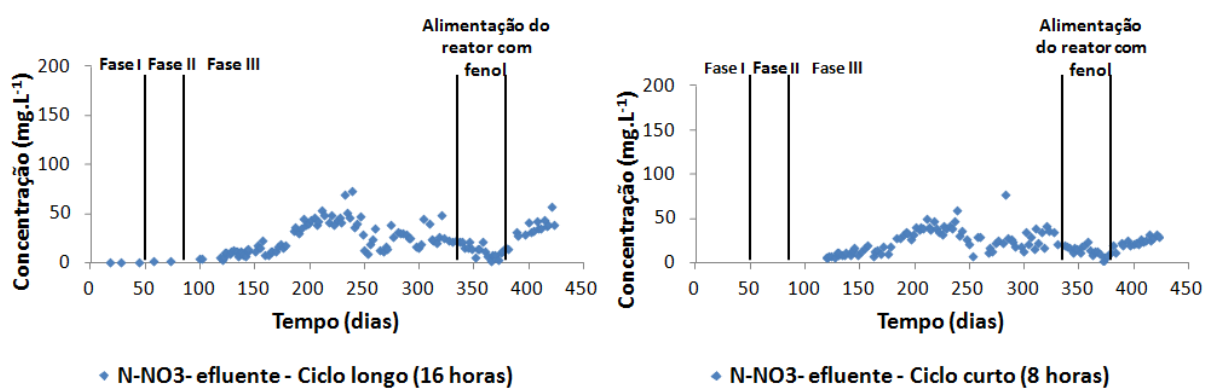


FIGURA 5.3 – Produção de N-NO₃⁻ no RBS ao longo do tempo de operação – ciclo longo (16 horas) e curto (8 horas)

Em geral, os perfis de consumo dos compostos nitrogenados (N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻) durante os ciclos longo (16 horas) e curto (8 horas) foram bastante similares. A fase I correspondeu aos primeiros 50 dias de operação do reator e foi marcada principalmente pela atividade de organismos desnitrificantes, devido à presença de condições anaeróbias, disponibilidade de matéria orgânica no lodo de inóculo e presença de nitrito. Nota-se que houve um intenso consumo de nitrito, o qual foi utilizado pelas bactérias desnitrificantes presentes no lodo de inóculo como aceptor de elétrons durante a oxidação da matéria orgânica. Além disso, as concentrações efluentes de N-NH₄⁺ foram maiores que as concentrações afluentes, provavelmente devido à morte e lise das bactérias aeróbias presentes no lodo. Isso ocorreu devido à liberação de nitrogênio orgânico das células mortas, o qual foi rapidamente convertido a nitrogênio amoniacal, que era liberado no efluente do reator. Matéria orgânica também foi disponibilizada devido à morte de bactérias aeróbias, proporcionando doadores de elétrons em quantidade suficiente para a ocorrência da desnitrificação heterotrófica. A ocorrência de desnitrificação heterotrófica endógena também foi relatada por diversos autores durante o período de *start-up* de reatores anammox (TOH *et al.*, 2002; LOPÉZ *et al.*, 2008; DAPENA-MORA *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011).

Durante a fase II (de 50 até aproximadamente 90 dias) observou-se uma redução da atividade de organismos desnitrificantes, devido à diminuição das concentrações dos compostos orgânicos presentes no meio. Essa etapa foi marcada por um menor consumo de nitrito. Além disso, as concentrações afluentes e efluentes de amônia permaneceram relativamente próximas. Na fase II, a redução da atividade desnitrificante deve ter favorecido o

estabelecimento dos organismos anammox, já que estes dois grupos de bactérias podem competir pelo mesmo aceptor de elétrons (NO_2^-) (CHANCHOI *et al.*, 2008; GÜVEN *et al.*, 2005; MOLINUEVO *et al.*, 2009; LACKNER *et al.*, 2008).

A partir do 90º dia de operação (fase III) foi detectada a atividade anammox no RBS, corroborando com resultados previamente descritos na literatura. Foi observado que a obtenção de atividade anammox em reatores em batelada sequenciais, operados em escala de bancada, em que foi utilizado como inóculo lodo ativado convencional, pode demandar um tempo que varia de 50 a 120 dias (DAPENA-MORA *et al.*, 2004; CHAMCHOI & NITSORAVUT, 2007; LÓPEZ *et al.*, 2008; CAMPOS, 2011). Nesta fase de operação foi observado o consumo simultâneo de N-NO_2^- e N-NH_4^+ em proporções estequiométricas bem próximas às descritas na literatura para bactérias anammox, 1,32 mol de N-NO_2^- consumido por mol de N-NH_4^+ consumido. Além disso, a proporção estequiométrica da produção de N-NO_3^- por mol de N-NH_4^+ consumido permaneceu, na maior parte do tempo de operação, próxima ao valor descrito na literatura para a reação anammox (0,26) (STROUS *et al.*, 1998). Esses resultados podem ser observados nas Figuras 5.4 e 5.5, nas quais são apresentadas as séries históricas dos coeficientes estequiométricos para a reação anammox obtidas neste experimento durante a fase III.

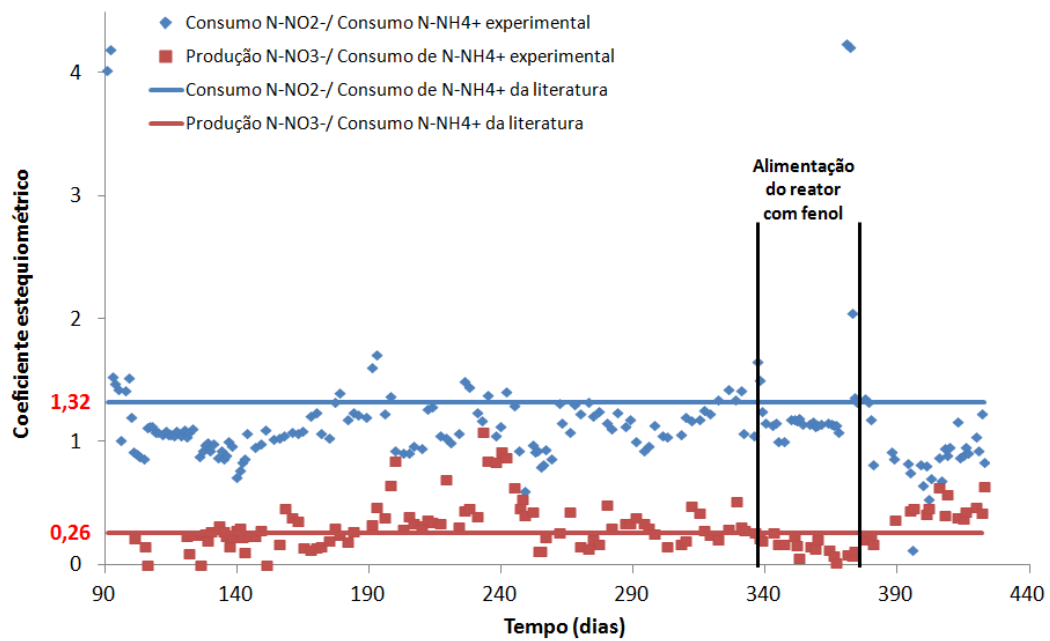


FIGURA 5.4 – Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/ consumo de amônia e da produção de nitrato/ consumo de amônia durante toda a fase III de operação – Ciclo longo (16 horas)

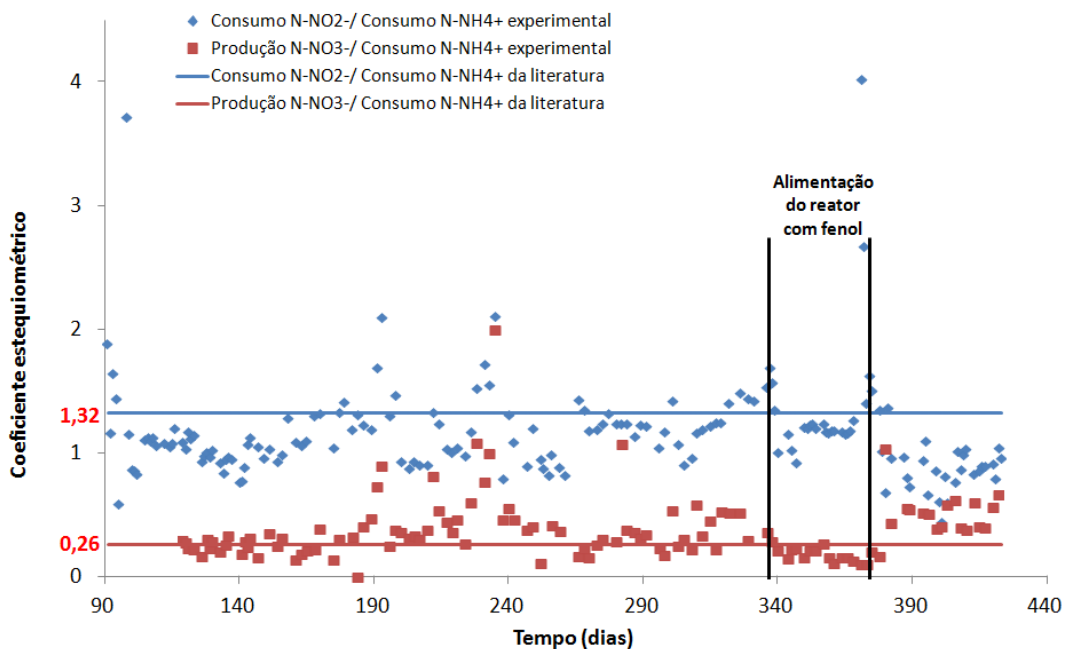


FIGURA 5.5 – Coeficiente estequiométrico do consumo de nitrito/ consumo de amônia e da produção de nitrato/ consumo de amônia durante toda fase III de operação – Ciclo curto (8 horas)

A estatística descritiva dos coeficientes estequiométricos obtidos neste experimento a partir da fase III (90 a 335 dias) é apresentada na Tabela 5.1 e nas Figuras 5.6 e 5.7. As médias obtidas para o coeficiente de consumo de N-NO_2^- / consumo de N-NH_4^+ foram de 1,16 (ciclo longo) e 1,25 (ciclo curto) e as medianas 1,09 (ciclo longo) e 1,11 (ciclo curto), valores próximos aos relatados na literatura para a reação anammox (1,32), porém, um pouco menores neste estudo. Toh *et al.* (2002) também obtiveram em seu reator anammox, coeficiente estequiométrico médio de consumo de N-NO_2^- / consumo de N-NH_4^+ menor, igual a 1,1. Campos (2011) relatou que o coeficiente obtido em seu experimento de enriquecimento de bactérias anammox se manteve próximo a 1,0, sendo que em seu experimento foi utilizado um RBS, o qual foi inoculado com lodo ativado obtido da mesma estação de tratamento de esgotos que forneceu o inóculo utilizado neste estudo. Em contrapartida, coeficiente maior foi obtido em RBS anammox por Chamchoi & Nitorisavut (2007), igual a 1,5, em média, e também por Quan *et al.* (2008), que obtiveram coeficiente igual a 1,46, em um reator anaeróbico de fluxo ascendente operado sob condições anammox.

As médias e medianas obtidas para o coeficiente produção de N-NO_3^- / consumo de N-NH_4^+ também foram bem próximos aos da literatura (0,26), entretanto, um pouco maiores neste estudo. Para o ciclo longo, foi obtida média igual a 0,33 e mediana igual a 0,29. E para o ciclo curto, foi obtida média de 0,39 e mediana de 0,32. Ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo, a média do coeficiente estequiométrico produção de N-NO_3^- / consumo de N-NH_4^+ obtida por Chamchoi & Nitorisavut (2007), foi menor, igual a 0,04. Os autores sugeriram que isto pode estar relacionado à presença de outros grupos de microrganismos coexistindo com bactérias anammox, provavelmente responsáveis pela redução de nitrato, como bactérias desnitrificantes, por exemplo.

TABELA 5.1 – Estatística descritiva dos coeficientes estequiométricos obtidos durante a fase III (90 a 335 dias) antes da alimentação do reator com fenol.

Ciclo Estatística	Consumo $\text{N-NO}_2^- / \text{Consumo N-NH}_4^+$		Produção $\text{N-NO}_3^- / \text{Consumo N-NH}_4^+$	
	16 horas	8 horas	16 horas	8 horas
Nº de dados	186	173	95	83
Média	1,16	1,25	0,33	0,39
Desvio-padrão	0,50	0,90	0,20	0,27
Coefficiente de variação	0,40	0,70	0,61	0,70
Mediana	1,09	1,11	0,29	0,32
Mínimo	0,12	0,44	0	0
Máximo	4,25	11,08	1,09	2,00
Percentil 10%	0,87	0,83	0,14	0,18
Percentil 25%	0,95	0,95	0,21	0,24
Percentil 75%	1,22	1,24	0,39	0,45
Percentil 90%	1,48	1,44	0,53	0,60

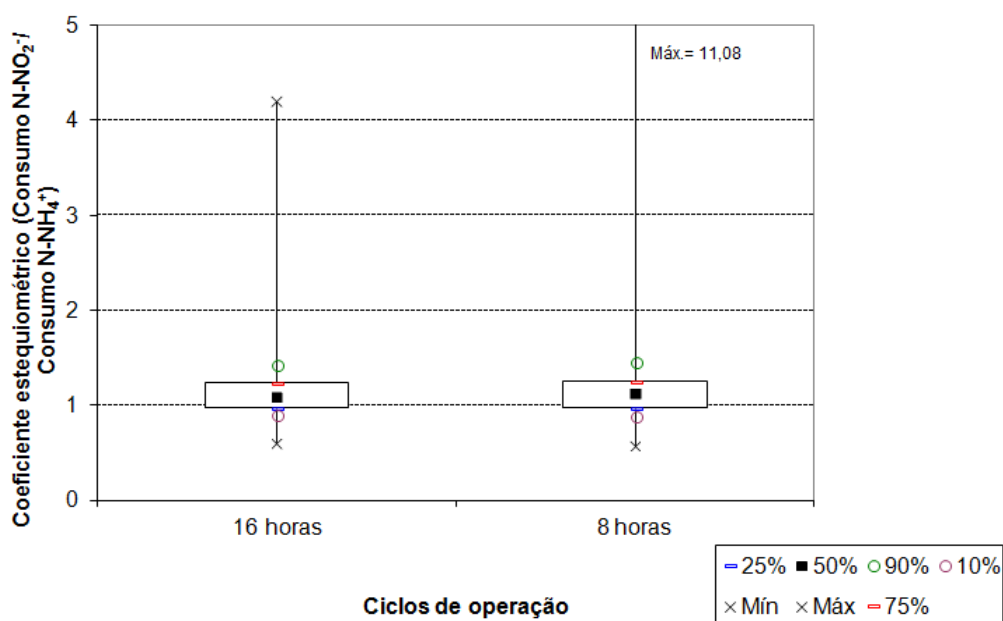


FIGURA 5.6 - Box-plot do coeficiente estequiométrico Consumo de $\text{NO}_2^- / \text{Consumo de N-NH}_4^+$ obtidos para o RBS durante a fase III (90 a 335 dias), antes da alimentação do reator com fenol.

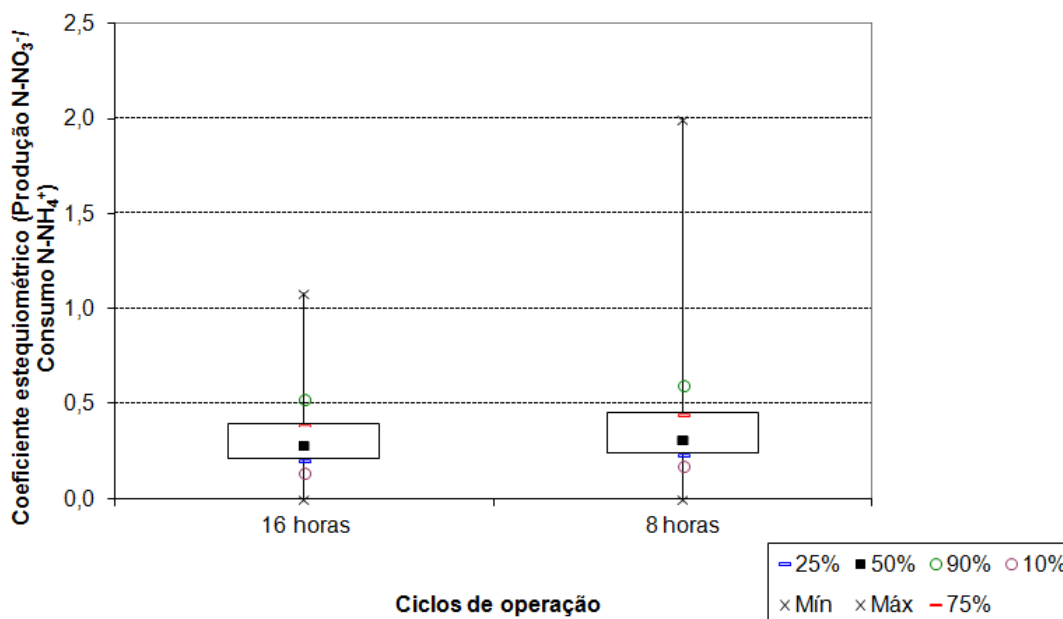


FIGURA 5.7 – *Box-plot* do coeficiente estequiométrico Produção de N-NO_3^- / Consumo de N-NH_4^+ obtido para o RBS durante a fase III (90 a 335 dias), antes da alimentação do reator com fenol.

Durante a fase III foram alcançadas eficiências de remoção de N-NO_2^- e N-NH_4^+ elevadas em ambos os ciclos de operação do RBS (Figuras 5.8 e 5.9). De 90 até aproximadamente 200 dias de operação as concentrações afluentes dos compostos nitrogenados foram aumentadas gradativamente de 20 mg.L^{-1} até 160 e 177 mg.L^{-1} de nitrogênio nitroso e amoniacal, respectivamente. Durante esse período, as médias de remoção de nitrito foram iguais a 95% para o ciclo longo e 89% para o ciclo curto. As médias de remoção de amônio foram de 81% e 76% para os ciclos longo e curto, respectivamente.

De 200 até 250 dias de operação, quando as concentrações de nitrogênio afluentes permaneceram elevadas, observou-se uma redução na eficiência de remoção dos compostos nitrogenados, que atingiu valores tão baixos quanto 31% para N-NH_4^+ e 50% para N-NO_2^- durante o ciclo longo e 17% para N-NH_4^+ e 40% para N-NO_2^- durante o ciclo curto. Estudos que investigaram a inibição do processo anammox demonstram que o nitrito em elevadas concentrações pode exercer um efeito adverso sobre a atividade dessas bactérias. Egli *et al.* (2001) verificou que concentrações de nitrogênio na forma de nitrito iguais a 185 mg.L^{-1}

inibiram completamente a atividade anammox em um reator em escala laboratorial, valor bem próximo ao encontrado neste estudo (160 mg.L^{-1}). No entanto, apesar da eficiência de remoção dos compostos nitrogenados ter sido reduzida nesse período, não houve perda total da atividade anammox, uma vez que as relações de consumo ($\text{N-NO}_2^-:\text{N-NH}_4^+$) ainda se mantiveram próximas a 1,32:1 (Figuras 5.4 e 5.5). Dapena-Mora *et al.* (2007) encontraram concentrações maiores de nitrito (350 mg N-NO_2^-) reduzindo pela metade a atividade de bactérias anammox.

Para evitar que a inibição do processo anammox ocorresse por completo, as concentrações afluentes dos compostos nitrogenados foram reduzidas para aproximadamente $90 \text{ mg N-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ e $118 \text{ mg N-NO}_2^-.\text{L}^{-1}$, após 250 dias de operação o que culminou no restabelecimento da eficiência de remoção de nitrogênio no RBS.

Em geral, para o ciclo de 8 horas, foram observadas eficiências de remoção de nitrogênio menores durante a fase anammox (fase III). Isso pode ser explicado devido ao menor tempo disponível para a reação do meio afluente com a biomassa anammox durante este ciclo de operação (Figura 5.9).

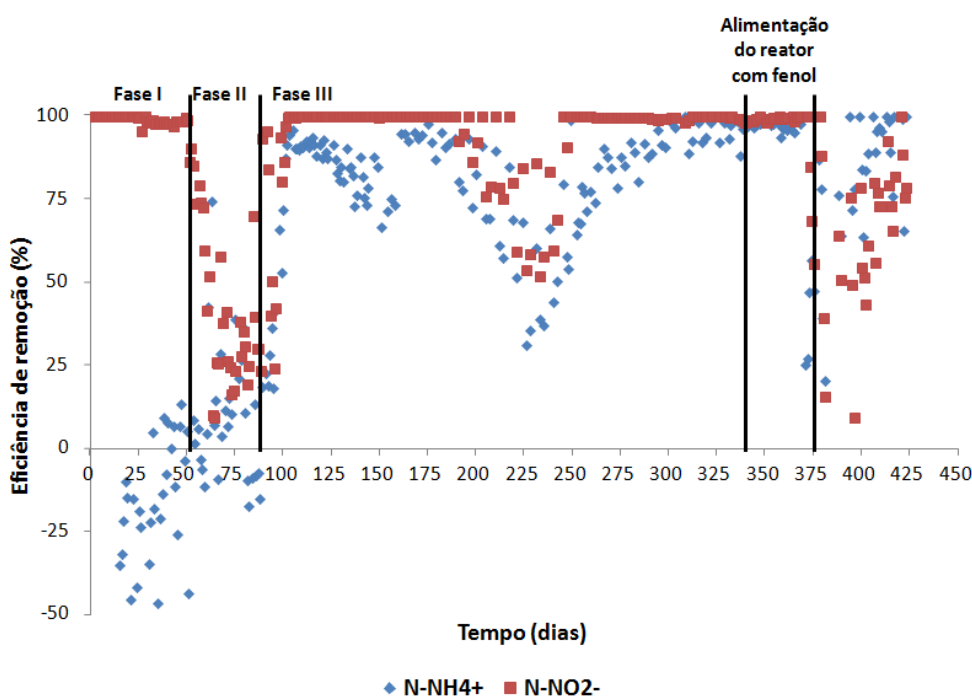


FIGURA 5.8 – Eficiência de remoção de N-NH_4^+ e N-NO_2^- no RBS durante todo o período operacional – Ciclo longo (16 horas)

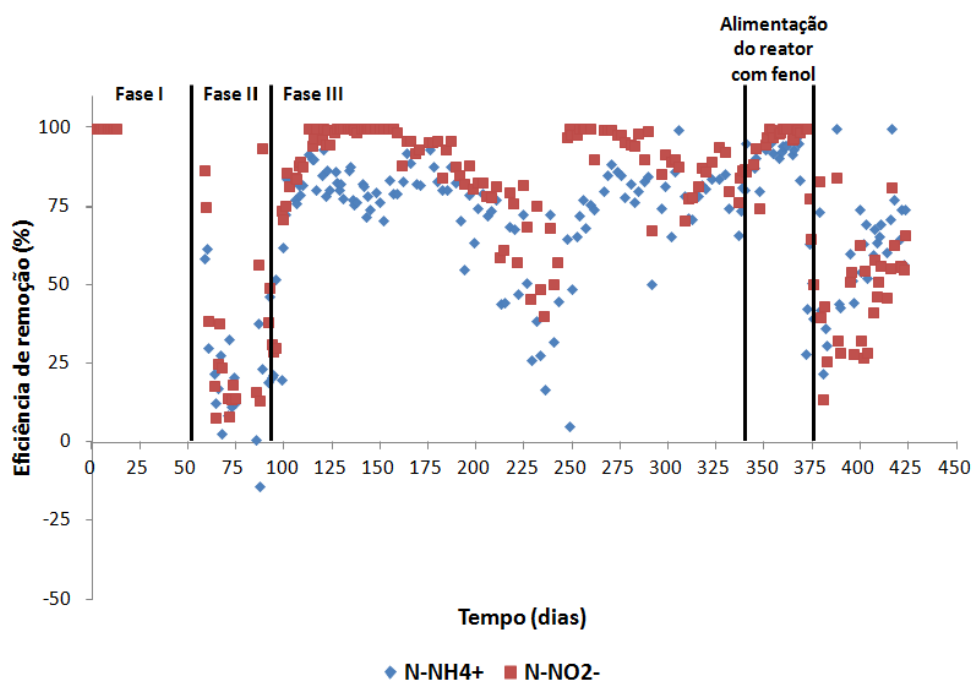


FIGURA 5.9 – Eficiência de remoção de N-NH_4^+ e N-NO_2^- no RBS durante todo o período operacional – Ciclo curto (8 horas)

As eficiências médias de remoção dos compostos nitrogenados em cada fase operacional são resumidas na Tabela 5.2. As eficiências médias de remoção de nitrogênio nitroso durante a fase I foram muito elevadas, iguais a 99% e 100% para os ciclos de 16 horas e 8 horas, respectivamente. Isso ocorreu por causa da atividade de bactérias desnitrificantes, inicialmente presentes no lodo de inóculo, conforme discutido anteriormente. Em contrapartida, as médias de remoção de nitrogênio amoniacal foram negativas nesta fase inicial, -89% e -301%, para ciclos longo e curto, respectivamente. Campos (2011) também reportou eficiências de remoção de amônia negativas durante o período inicial do enriquecimento de bactérias anammox em RBS utilizando lodo ativado convencional como inóculo. O lodo ativado compõe um sistema de tratamento aeróbio e contém, em sua constituição uma ampla variedade de bactérias que possuem obrigatoriamente, esse tipo de metabolismo. Dessa forma, quando disposto em um reator operado em condições predominantemente anaeróbias, essas bactérias podem não resistir às novas condições ambientais, morrendo e liberando o nitrogênio de suas células para o meio. Sabe-se que o nitrogênio orgânico pode ser convertido rapidamente a nitrogênio amoniacal pelo processo de amonificação. Dessa forma, a concentração de nitrogênio amoniacal liberado no efluente

durante o início da operação do RBS foi muito superior à concentração afluyente desse composto, culminando em eficiências de remoção negativas.

As eficiências médias de remoção de nitrito durante a fase II diminuíram consideravelmente (44% para o ciclo longo e 33% para o ciclo curto) em relação à fase I. Esse fato indica que a atividade dos organismos desnitrificantes nesse período foi sendo reduzida. Não obstante, as eficiências médias de remoção de amônia aumentaram consideravelmente em relação à fase anterior, sendo iguais a 7% para o ciclo longo e 22% para o ciclo curto.

A fase III, caracterizada por intensa atividade anammox, foi marcada por eficiências médias elevadas de remoção de nitrogênio na forma de nitrito (94% e 86% para os ciclos longo e curto, respectivamente) e de nitrogênio amoniacal (79% e 72% para os ciclos longo e curto, respectivamente). Campos (2011) realizou dois experimentos de enriquecimento de bactérias anammox utilizando um RBS semelhante ao utilizado no presente estudo. Os resultados obtidos em seu primeiro experimento demonstraram eficiências médias de remoção de amônia e nitrito iguais a 90% e no segundo experimento esses valores foram iguais a 60%. Cabe ressaltar que essas eficiências médias também foram obtidas durante a fase anammox de operação do reator, no entanto, as concentrações afluentes dos compostos nitrogenados durante esta fase em ambos os experimentos foram menores (Primeiro experimento: 30 a 100 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ afluyente e 30 a 80 mg N-NO₂⁻.L⁻¹ afluyente; Segundo experimento: 32 a 50 mg N-NH₄⁺.L⁻¹ e 46 a 60 mg N-NO₂⁻.L⁻¹).

TABELA 5.2 – Eficiências médias de remoção de nitrogênio durante as três fases operacionais do RBS (desconsiderando o período da fase III em que o reator foi alimentado com fenol).

FASE I (0 a 50 dias) – atividade desnitrificante predominante				
	Concentração afluente N-NO₂⁻ (mg.L⁻¹)	Eficiência de remoção média de N- NO₂⁻	Concentração afluente N-NH₄⁺ (mg.L⁻¹)	Eficiência de remoção média de N-NH₄⁺
Ciclo longo (16 horas)	21 a 30	99,1	20 a 34	-88,6
Ciclo curto (8 horas)		100		-301,3
FASE II (50 a 90 dias) – diminuição da atividade desnitrificante				
	Concentração afluente N-NO₂⁻ (mg.L⁻¹)	Eficiência de remoção média de N- NO₂⁻	Concentração afluente N-NH₄⁺ (mg.L⁻¹)	Eficiência de remoção média de N-NH₄⁺
Ciclo longo (16 horas)	21 a 30	43,9	21 a 34	6,7
Ciclo curto (8 horas)		33,2		21,7
FASE III (90 a 335 dias) – atividade anammox predominante				
	Concentração afluente N-NO₂⁻ (mg.L⁻¹)	Eficiência de remoção média de N-NO₂⁻	Concentração afluente N-NH₄⁺ (mg.L⁻¹)	Eficiência de remoção média de N-NH₄⁺
Ciclo longo (16 horas)	24 a 160	93,7	25 a 177	79,4
Ciclo curto (8 horas)		86,3		72,2

Na figura 5.10 são apresentados os valores das cargas de nitrogênio (N-NO₂⁻ mais N-NH₄⁺) aplicadas ao RBS e removidas ao longo de todo o tempo de operação (423 dias). Observa-se que após o início da atividade anammox (fase III) as cargas de nitrogênio foram sendo aumentadas gradativamente (de 90 até aproximadamente 250 dias) até atingir valores próximos a 350 g N.m⁻³.d⁻¹ e, nesse momento, houve perda na eficiência de remoção de nitrogênio, culminando em uma redução da carga de nitrogênio removida. Vale lembrar, que de 200 até 250 dias as concentrações afluentes de amônio e nitrito se mantiveram em seus valores mais elevados, alcançando 160 mg.L⁻¹ de N-NO₂⁻ e 177 mg.L⁻¹ de N-NH₄⁺ (Figuras 5.1 e 5.2), sendo provavelmente esta a causa da inibição da remoção de nitrogênio no RBS.

Por esse motivo, as cargas de nitrogênio aplicadas foram diminuídas para valores próximos a $200 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, (250 até 290 dias), momento em que a eficiência de remoção de nitrogênio se restabeleceu. É importante destacar que as cargas de nitrogênio afluentes foram diminuídas durante esse período por meio da redução das concentrações de nitrito e amônia afluentes para valores próximos a 90 mg.L^{-1} e 118 mg.L^{-1} de nitrogênio amoniacal e nitroso, respectivamente.

Após 290 dias, as cargas foram novamente aumentadas atingindo valores de $430 \text{ mg N.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$. O aumento da carga nitrogenada aplicada ao RBS nesse período não foi devido ao aumento das concentrações dos compostos nitrogenados no afluente e sim devido à diminuição do tempo de detenção hidráulica (TDH) no reator, que passou de 44 horas para 24 horas. Dessa maneira não foi observada diminuição na eficiência de remoção de nitrogênio no reator. De 290 até 335 dias de operação (antes do início da alimentação do reator com fenol) a carga média de nitrogênio removida foi de $360 \text{ mg N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, atingindo valor máximo igual a $390 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Resultados semelhantes foram obtidos por Wang *et al.* (2011), os quais conseguiram em um RBS anammox (6,5L de volume) cargas máximas de nitrogênio removidas iguais a $400 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. No entanto, resultados superiores foram alcançados por López *et al.* (2008), o qual aplicou uma carga de nitrogênio afluente a um RBS anammox, também em escala laboratorial, porém com volume de trabalho bastante superior (variando de 14,3 a 15,8L), igual a $1,6 \text{ kg N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e obteve 99,7% de eficiência de remoção. Não obstante, já foi relatado na literatura cargas de nitrogênio removidas tão altas quanto $75 \text{ kg N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ em reatores anammox em escala laboratorial. Nesse caso, o reator utilizado tinha configurações semelhantes à de um reator UASB com biomassa anammox granular (TANG *et al.*, 2011b).

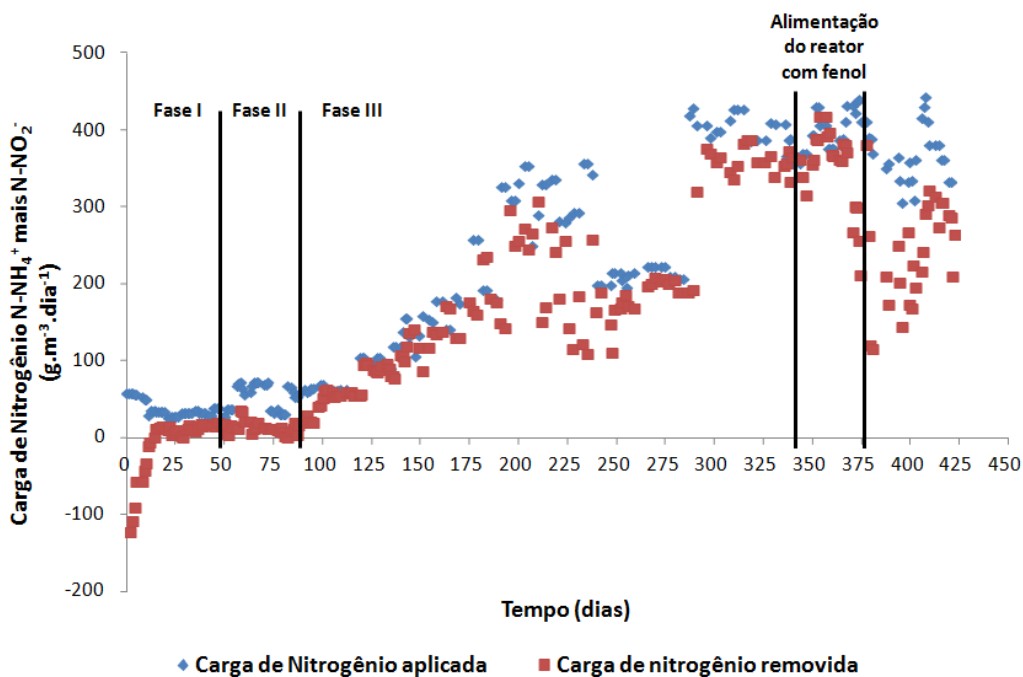


FIGURA 5.10 – Cargas de nitrogênio (N-NH_4^+ e N-NO_2^-) aplicadas e removidas do RBS ao longo de todo o período operacional

5.2 Avaliação do efeito da alimentação do RBS com concentrações crescentes de fenol

Para avaliar se o fenol seria capaz de exercer algum efeito tóxico sobre o processo anammox no RBS, esse composto foi adicionado ao reator durante um período de 42 dias (335 a 377 dias). A concentração afluyente inicial de fenol no reator foi igual a 10 mg.L^{-1} e a cada semana, era incrementada até atingir 300 mg.L^{-1} . A adição de fenol era realizada no início do ciclo longo (16 horas) de operação do reator. Esse composto não foi adicionado ao reator durante o ciclo curto (8 horas) a fim de evitar que se acumulasse no interior do mesmo. A Figura 5.11 apresenta a dinâmica dos compostos nitrogenados no RBS durante o período de 290 a 423 dias de operação. Períodos anterior (290 a 334 dias) e posterior (378 a 423 dias) à alimentação do reator com fenol também são observados na figura, de modo que é possível analisar a remoção de nitrogênio nos mesmos, em comparação com a remoção de nitrogênio no período em que foi adicionado o fenol no RBS. As concentrações afluentes de amônia e nitrito durante todo esse período (290 a 423 dias) permaneceram próximas a 90 e 118 mg.L^{-1} , respectivamente.

Os resultados demonstraram que no período anterior à alimentação do reator com fenol, estava havendo boa remoção dos compostos nitrogenados, o que é evidenciado pelas baixas concentrações de N-NH_4^+ efluentes, variando entre 1 e 10 mg.L^{-1} , e de N-NO_2^- efluentes, as quais permaneceram entre 0 e 2 mg.L^{-1} . Quando o fenol começou a ser adicionado ao reator, até atingir concentração igual a 200 mg.L^{-1} observou-se que as baixas concentrações de nitrogênio efluentes se mantiveram. Entretanto, quando foi aplicada concentração igual a 300 mg.L^{-1} de fenol, maior concentração de amônia no efluente foi observada, chegando a valores iguais a 74 mg.L^{-1} , reduzindo desta forma a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal que se encontrava próxima a 97% e caiu para cerca de 40%. A concentração de nitrito efluente também aumentou, chegando a 51 mg.L^{-1} , culminando em uma diminuição na eficiência de remoção desse composto, a qual foi reduzida de aproximadamente 100% para 81%. Essas concentrações afluentes de nitrogênio se mantiveram elevadas, mesmo após suspensão da alimentação do reator com fenol. Entretanto, observou-se que após 45 dias do término da adição de fenol ao RBS, quando o reator estava sendo operado novamente em condições autotróficas, houve uma melhora nas eficiências de remoção de nitrogênio, que ficaram próximas a 85% e 95% para nitrogênio nitroso e amoniacal, respectivamente.

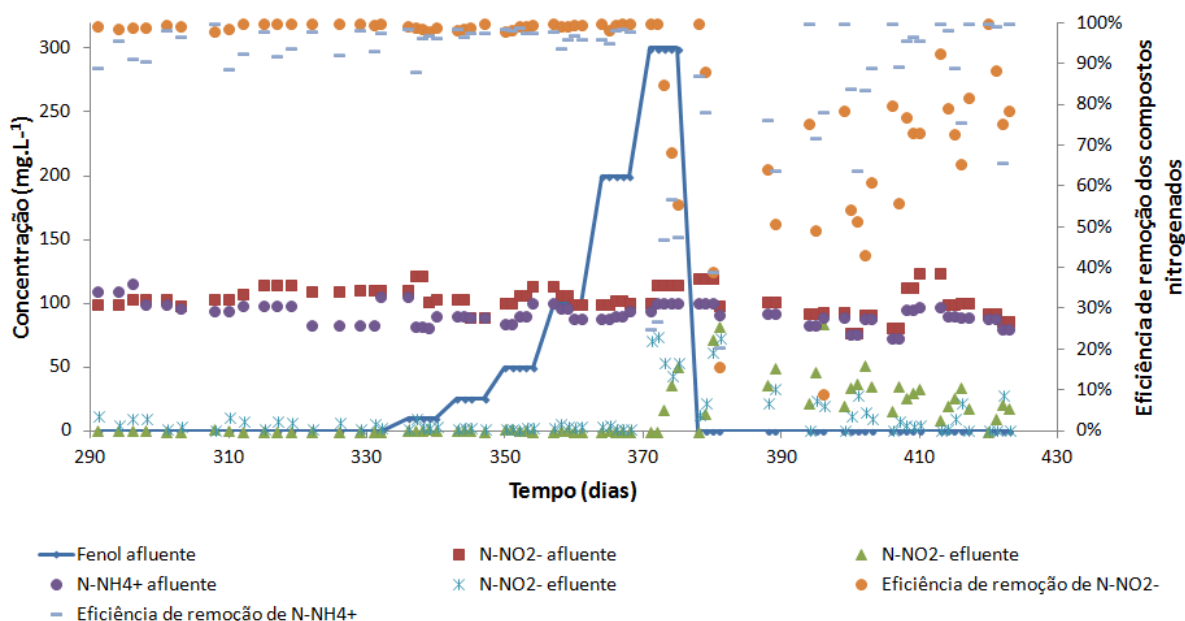


FIGURA 5.11 – Dinâmica e eficiência de remoção dos compostos nitrogenados no RBS durante o experimento de alimentação do reator com fenol (ciclo longo).

Na Tabela 5.3 é apresentada a estatística descritiva das eficiências de remoção de nitrito, amônia e do coeficiente $N-NO_2^-$ consumido/ $N-NH_4^+$ consumida sob as diferentes concentrações de fenol adicionadas ao RBS.

TABELA 5.3 – Estatística descritiva das eficiências de remoção de nitrito, amônia e do coeficiente $N-NO_2^-$ / $N-NH_4^+$ sob diferentes concentrações de fenol adicionadas ao RBS

Eficiência de remoção de $N-NO_2^-$							
Concentração de fenol (mg.L⁻¹)	0	10	25	50	100	200	300
Nº de dados	17	5	4	5	5	5	5
Média	99,56	98,82	99,12	98,94	99,61	99,64	81,81
Desvio-padrão	0,6	0,5	0,6	0,7	0,2	0,6	19,6
Coeficiente de variação	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,24
Mediana	99,8	98,9	99,0	99,3	99,6	99,9	85,0
Mínimo	98,15	97,99	98,56	98,17	99,39	98,56	55,57
Máximo	100,00	99,22	100,00	99,56	100,00	100,00	100,00
Percentil 25%	99,2	98,9	98,7	98,3	99,5	99,7	68,5
Percentil 75%	100,0	99,1	99,4	99,3	99,6	100,0	100,0
Eficiência de remoção de $N-NH_4^+$							
Concentração de fenol (mg.L-1)	0	10	25	50	100	200	300
Nº de dados	17	5	4	5	5	5	5
Média	94,51	95,32	97,67	98,29	96,18	97,24	40,67
Desvio-padrão	3,6	4,1	0,8	0,6	1,5	1,6	13,9
Coeficiente de variação	0,04	0,04	0,01	0,01	0,02	0,02	0,34
Mediana	93,8	96,5	97,7	98,5	96,2	97,9	47,0
Mínimo	88,77	88,12	96,73	97,56	93,82	95,18	25,10
Máximo	100,00	98,50	98,56	99,10	97,89	98,78	56,79
Percentil 25%	92,1	96,4	97,4	97,7	96,0	96,0	27,0
Percentil 75%	98,0	97,0	98,0	98,6	97,0	98,4	47,5
Coeficiente $N-NO_2^-$ consumido/ $N-NH_4^+$ consumido							
Concentração de fenol (mg.L-1)	0	10	25	50	100	200	300
Nº de dados	17	5	4	5	5	5	5
Média	1,17	1,33	1,08	1,18	1,15	1,14	2,65
Desvio-padrão	0,2	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	1,5
Coeficiente de variação	0,13	0,19	0,07	0,02	0,01	0,02	0,56
Mediana	1,2	1,3	1,1	1,2	1,1	1,1	2,1
Mínimo	0,93	1,06	1,01	1,15	1,14	1,09	1,33
Máximo	1,43	1,66	1,16	1,20	1,17	1,16	4,25
Percentil 25%	1,1	1,2	1,0	1,2	1,1	1,1	1,4
Percentil 75%	1,3	1,5	1,1	1,2	1,2	1,2	4,2

Com relação à eficiência de remoção de nitrogênio na forma de nitrito, os resultados obtidos demonstraram que quando as concentrações de fenol variaram de 0 a 200 mg.L⁻¹ as medianas de remoção de nitrogênio foram bem próximas a 99%. Somente quando a concentração de fenol afluente foi aumentada para 300 mg.L⁻¹ houve redução da eficiência de remoção de nitrogênio para 85% (Figura 5.12). Essa redução, entretanto, não foi considerada significativa segundo o teste *Kruskal-Wallis* a um nível de significância igual a 5% (p-valor=0,1060). Não obstante, esses resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que um número muito pequeno de dados foi considerado para esta análise (Tabela 5.3).

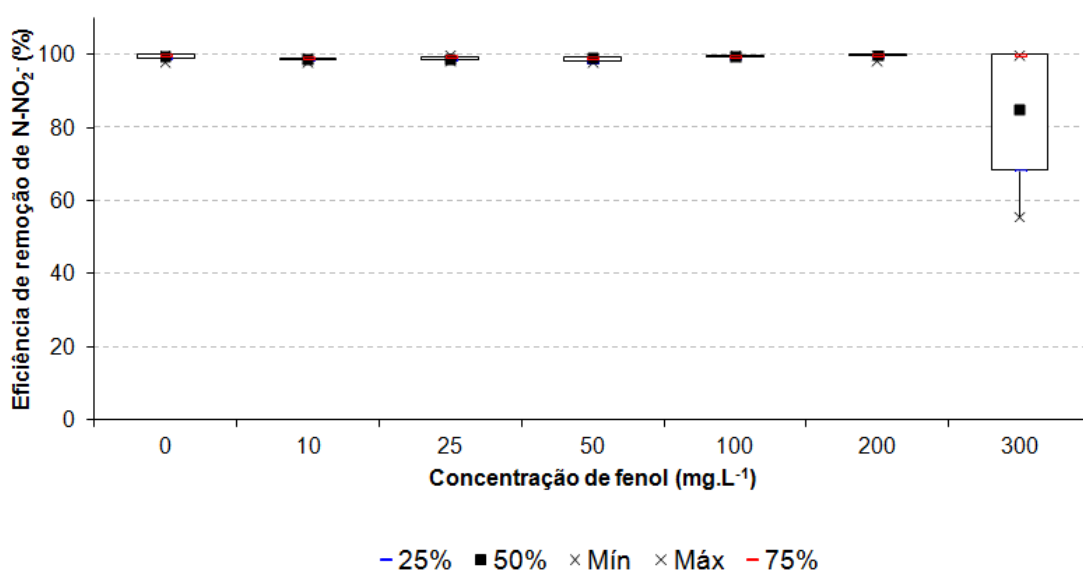


FIGURA 5.12 – *Box-plot* das eficiências de remoção de N-NO₂⁻ durante o experimento de alimentação do reator com fenol.

Na Figura 5.13 são apresentados os resultados para as eficiências de remoção de N-NH₄⁺. Foi verificado que houve diferença significativa entre as medianas obtidas, a um nível de significância de 5% (p-valor=0,0193; teste *Kruskal-Wallis*). Observa-se que as medianas das eficiências de remoção de amônia permaneceram próximas a 95% quando as concentrações de fenol variaram de 0 a 200 mg.L⁻¹. Assim como no caso do nitrito somente quando a concentração de fenol passou a ser 300 mg.L⁻¹ a mediana da eficiência de remoção de nitrogênio reduziu para 47%. No entanto, pelo teste de comparações múltiplas entre as

medias, foi verificado que as eficiências de remoção de amônia diferiram significativamente apenas entre os períodos com concentrações de fenol iguais a 300 e 25 mg.L⁻¹ (p-valor=0,026851), 300 e 50 mg.L⁻¹ (p-valor=0,001065) e 300 e 200 mg.L⁻¹ (p-valor=0,024134). Mais uma vez, o pequeno número de dados utilizados pode ter comprometido tal análise, impedindo a detecção de diferenças possivelmente existentes entre outros períodos.

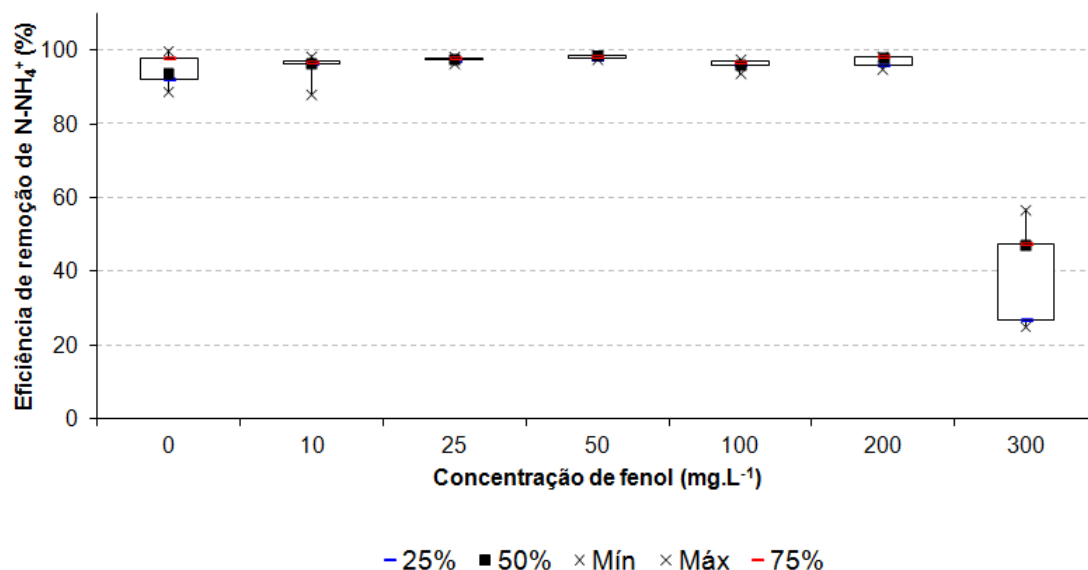


FIGURA 5.13 – *Box-plot* das eficiências de remoção de N-NH₄⁺ durante o experimento de alimentação do reator com fenol

A fim de avaliar se o fenol teve efeito inibidor sobre a remoção de nitrogênio pelo processo anammox no reator, foram analisados os valores obtidos para a razão estequiométrica N-NO₂⁻ consumido/ N-NH₄⁺ consumido sob as diferentes concentrações de fenol testadas (Figura 5.14). Sabe-se que as bactérias anammox removem nitrito e amônia na proporção de 1,32:1 (Strous *et al.*, 1998). Valor bem próximo foi obtido durante todo o experimento de alimentação do reator com fenol (entre 1,1 e 1,3), à exceção de quando a concentração afluente de fenol foi igual a 300 mg.L⁻¹, quando o coeficiente aumentou para 2,1. Esses resultados indicaram que mesmo com a eficiência de remoção de nitrito aparentemente reduzida, houve um maior consumo desse composto em relação à amônia, quando o reator foi submetido à elevada concentração de fenol (300 mg.L⁻¹), o que ocasionou a perturbação da atividade de bactérias anammox, possibilitando o consumo do nitrito por outras vias, que não

a oxidação anaeróbia da amônia. De acordo com a análise estatística aplicada, foram detectadas diferenças entre as medianas dos coeficientes estequiométricos pelo teste *Kruskal-wallis* (p-valor=0,0098), entretanto, os coeficientes estequiométricos só diferiram significativamente entre as concentrações 300 mg.L⁻¹ e 25 mg.L⁻¹ (p-valor=0,012088).

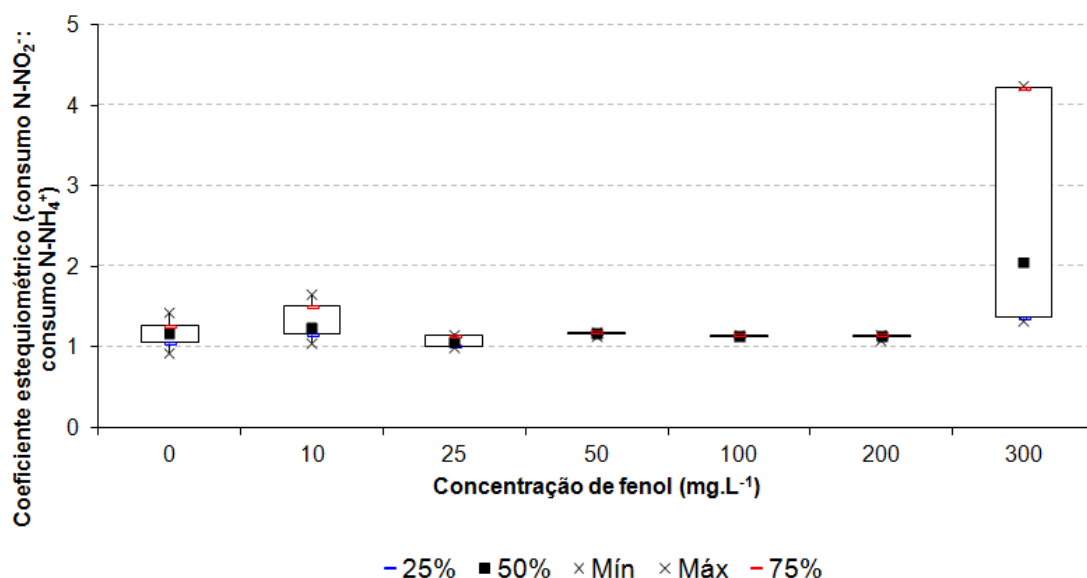


FIGURA 5.14 – *Box-plot* dos coeficientes N-NO₂⁻ consumido/ N-NH₄⁺ consumido durante o experimento de alimentação do reator com fenol

Em estudos conduzidos por Toh & Ashbolt (2002) realizou-se a aclimatação de uma cultura de bactérias anammox a um efluente contendo concentrações crescentes de fenol durante um período de 15 meses em um reator de escala laboratorial de um litro de volume, com meio suporte e fluxo contínuo ascendente. Os resultados obtidos nesse experimento demonstraram que concentrações de fenol iguais a 50 mg.L⁻¹ já foram capazes de perturbar a remoção de nitrogênio pelo processo anammox, causando um aumento da remoção de nitrito em relação à remoção de amônia, e alterando dessa forma o coeficiente estequiométrico da reação anammox que normalmente variava de 1,0 a 1,3 e passou a ser 2,5 após a adição de fenol. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho, entretanto, concentrações mais elevadas de fenol (300 mg.L⁻¹) foram requeridas para que houvesse alguma perturbação no processo anammox, alterando o coeficiente estequiométrico da reação de 1,1 para 2,1 e promovendo uma diminuição de 48% na eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal e de 15% na eficiência de remoção de nitrogênio nitroso.

Toh & Ashbolt (2002) conseguiram adaptar as bactérias anammox ao efluente contendo fenol, porém, um longo período foi requerido (15 meses). Após esse período o reator anammox foi capaz de remover nitrito ($78 \text{ g N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e amônia ($62 \text{ g N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) em proporções estequiométricas típicas da reação anammox, mesmo em concentrações afluentes de fenol iguais a $330 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Os resultados do estudo realizado por Toh & Ashbolt (2002), assim como os resultados obtidos no presente estudo, sugerem que o processo anammox tem potencial para ser aplicado para a remoção de nitrogênio de efluentes que contenham compostos tóxicos como o fenol, uma vez que concentrações elevadas desse composto, iguais a $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, não foram capazes de inibir a remoção dos compostos nitrogenados pelas bactérias anammox. Vale ressaltar que, no presente estudo o experimento foi realizado em um curto período de tempo (42 dias) e as análises estatísticas realizadas partiram de um número pequeno de dados, não sendo, portanto, conclusivas. Por esse motivo, recomenda-se que maiores investigações sejam realizadas antes da aplicação do processo em escala plena para o tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos. Ademais, efluentes reais podem conter além do fenol, uma ampla gama de outras substâncias potencialmente tóxicas, as quais podem agir simultaneamente causando a inibição da reação anammox.

Nesse sentido, tem sido investigados os efeitos tóxicos do fenol juntamente com outras substâncias como os sulfetos, por exemplo. Fenóis e sulfetos são dois compostos tipicamente encontrados em efluentes de coqueria da indústria siderúrgica. Em estudo recente, foi verificado que o efeito inibidor dos dois compostos em conjunto foi maior do que o efeito de cada composto individualmente (YANG & JIN, 2012). No caso dos efluentes de coqueria, em particular, as concentrações de amônia são bastante elevadas, podendo chegar a $1200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e as relações C/N são relativamente baixas, o que favoreceria a aplicação do processo anammox para a remoção biológica de nitrogênio (MARAÑÓN *et al.*, 2008; QUEIROZ, 2009). Porém, cerca de 80% da DQO desse tipo de despejo é constituída por fenol e por esse motivo as investigações sobre a toxicidade desse composto sobre a oxidação anaeróbia da amônia tornam-se imprescindíveis para avaliar a aplicabilidade do processo para tratar esse tipo de efluente (ZHANG *et al.*, 1998).

5.3 Caracterização da biomassa no interior do RBS

No início da operação do RBS a biomassa tinha um aspecto escuro, e encontrava-se dispersa no interior do reator. A partir do 150º dia de operação foi observada a formação de biofilmes nas paredes do reator e, além disso, ocorreu a formação de grânulos com tamanhos variando de 1 a 4 mm, aproximadamente. Outro aspecto visualizado foi uma mudança na coloração da biomassa, a qual adquiriu um tom marrom alaranjado, característico de bactérias anammox (Figura 5.15).

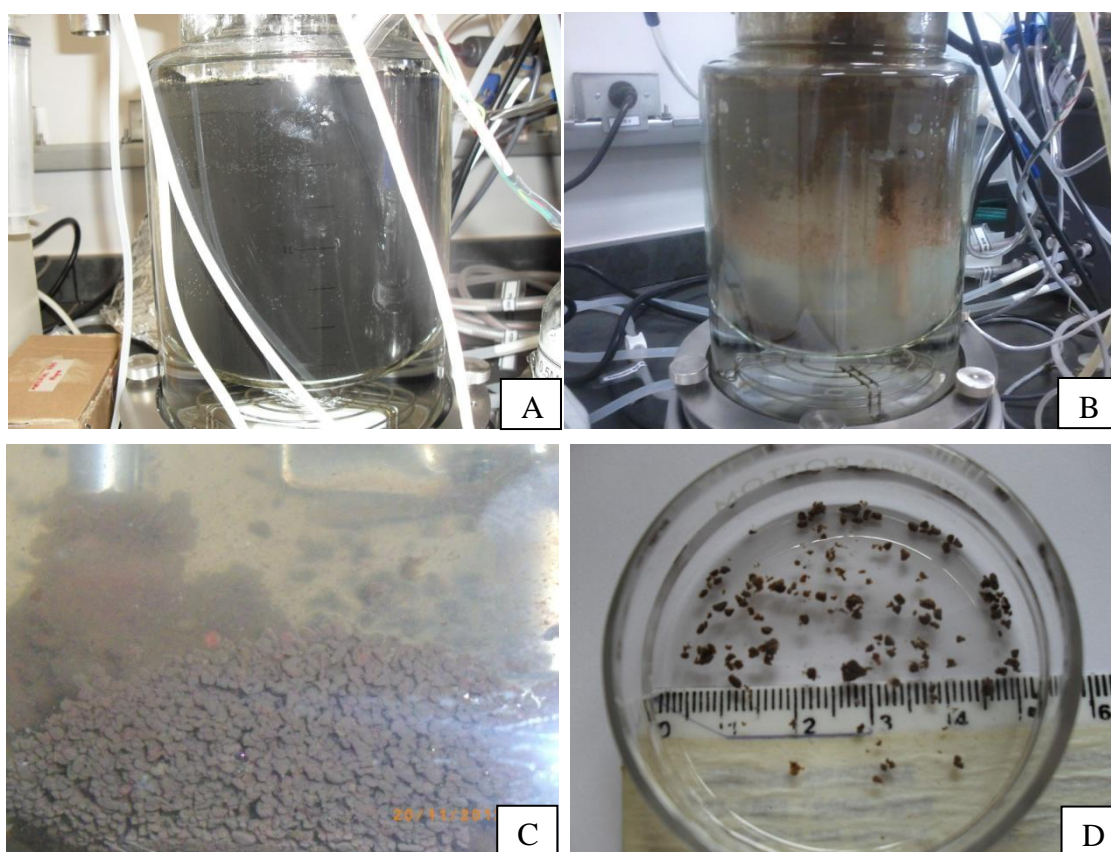


FIGURA 5.15 – Granulação da biomassa no RBS. (A) Biomassa no início da operação do RBS; (B) Biofilme formado na parede do RBS com coloração marrom alaranjada; (C) Grânulos formados no interior do RBS. (D) Grânulos retirados do RBS.

Segundo Jetten *et al.* (1998) bactérias anammox possuem coloração alaranjada devido à elevada concentração de citocromos no interior de suas células. Quanto à forma de crescimento da biomassa, é relatado na literatura que bactérias anammox se desenvolvem preferencialmente aderidas a meios suportes formando biofilmes ou em suspensão na forma granular (VAN DER STAR *et al.*, 2007). No presente trabalho, foram observadas as duas

formas de crescimento. López *et al.* (2008) também obtiveram biomassa anammox na forma granular em seu experimento de enriquecimento em um RBS. As causas apontadas para a granulação foi principalmente o modo de operação do reator, que consistia em bateladas com longos períodos de alimentação (cerca de seis horas), a agitação lenta da biomassa no interior do reator e o período de sedimentação longo, aproximadamente 20 minutos. No presente estudo, condições semelhantes foram utilizadas durante os ciclos de operação do RBS. Durante quase todo o experimento, o período de alimentação foi de cerca de 4 horas, a biomassa no interior do reator foi misturada lentamente (50 rpm) e o período de sedimentação da biomassa ao final de cada batelada foi de 20 a 30 minutos.

5.4 Detecção de bactérias anammox no RBS

5.4.1 PCR

Os resultados da detecção de bactérias anammox pela PCR utilizando os iniciadores Pla 46f/Amx 820r foram positivos para a presença de DNAr 16S em todas as amostras analisadas, tanto no lodo utilizado como inóculo quanto em todas as amostras do reator coletadas ao longo do experimento (Figura 5.16). Observou-se que a intensidade da banda referente ao lodo de inóculo (canaleta 2) foi bastante menor que a intensidade das demais bandas (canaletas 3 a 7), sugerindo a existência de menor concentração de DNAr 16S de bactérias anammox no lodo de inóculo em relação às amostras coletadas após o início da atividade anammox no reator. Essa suspeita foi confirmada posteriormente, por meio dos resultados obtidos pela técnica de PCR em tempo real, que serão discutidos no item 5.5.

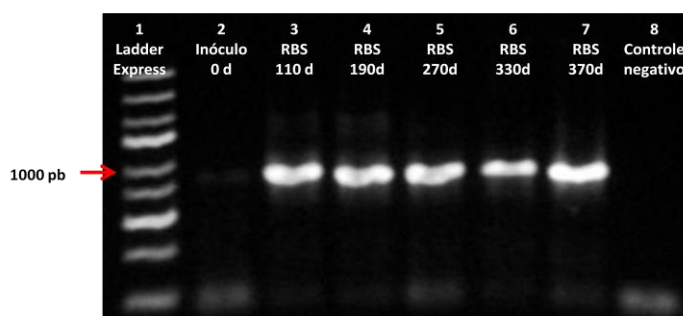


FIGURA 5.16 – Detecção de bactérias anammox pela PCR com iniciadores para o DNAr 16S de bactérias anammox (Pla 46f/ Amx 820r).

Foram utilizados também para a detecção de bactérias anammox iniciadores para a subunidade A (*HzsA*) do gene que codifica a enzima hidrazina sintase (*HzsA* 526f/ *HzsA* 1857r). Foram obtidos resultados positivos para as amostras coletadas no RBS nos dias 110, 190, 270, 330 e 370 dias (canaletas 3 a 6), entretanto, o resultado foi negativo para o lodo de inóculo (canaleta 2), possivelmente porque nesta amostra menor quantidade de bactérias anammox estava presente (Figura 5.17). O gene da hidrazina sintase tem sido considerado o único e mais específico marcador filogenético para bactérias anammox. A utilização desse marcador, em relação às abordagens que utilizam o RNAr 16S possui a vantagem de estar diretamente relacionado a fisiologia dos organismos alvo. Além disso, a presença desse gene não foi observada em outros grupos de microrganismos, somente em anaeróbios oxidadores de amônia, sendo, portanto, um marcador muito específico (HARHANGI *et al.*, 2012).

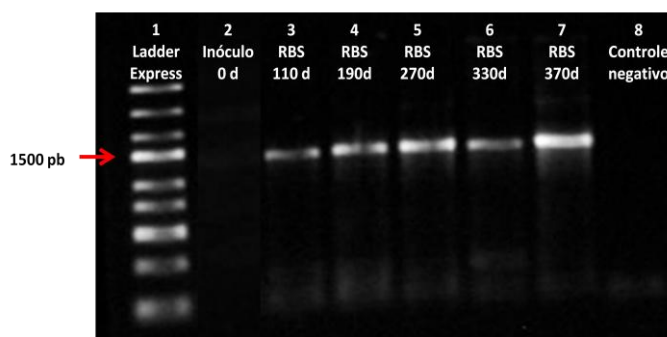


FIGURA 5.17 – Detecção de bactérias anammox pela PCR com iniciadores para a subunidade *HzsA* da enzima hidrazina sintase de bactérias anammox (*HzsA* 526f/*HzsA* 1857r).

Os resultados da PCR indicaram que as bactérias anammox permaneceram no reator ao longo de todo o tempo de operação, mesmo após a alimentação do reator do com fenol (Figuras 5.16 e 5.17; canaleta 7). Assim, a presença de condições adversas (ou seja, a presença de fenol, que é um composto orgânico tóxico) no RBS não contribuiu para a eliminação desses microrganismos do meio, apesar de ter afetado sua atividade, uma vez que a remoção dos compostos nitrogenados foi comprometida após a alimentação do reator com elevadas concentrações de fenol (300 mg.L^{-1}), reduzindo em 48% e 15% a eficiência de remoção de amônia e nitrito, respectivamente, em comparação com o período em que o reator era alimentado somente com meio de cultura autotrófico. Esses resultados foram suportados pela análise dos perfis da comunidade microbiana por meio da técnica de PCR-DGGE, que será discutida posteriormente, no item 5.6, deste trabalho.

5.4.2 FISH

A presença de bactérias anammox no RBS após 190 dias de cultivo também foi confirmada pela técnica de Híbridação *in situ* fluorescente (Figura 5.18). Foi possível observar microrganismos com morfologias características de bactérias anammox: células de aproximadamente 1 µm de diâmetro, em forma de cocos. No interior do citoplasma nota-se a presença de um compartimento não corado com DAPI e também com ausência de hibridação com a sonda Amx820, devido à ausência de material genético e também de ribossomos. Esse compartimento é possivelmente o anammoxossomo, uma estrutura membranosa presente no citoplasma, exclusiva das bactérias anammox (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004).

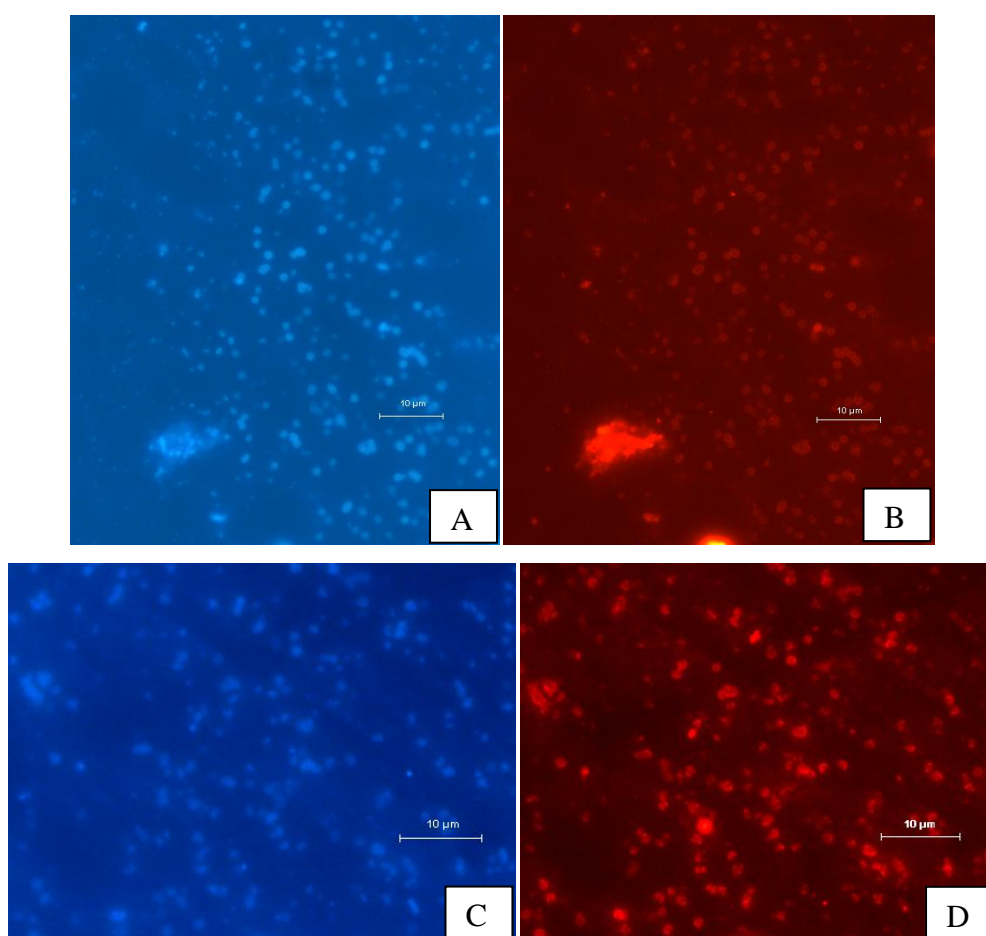


FIGURA 5.18 – Detecção de bactérias anammox no RBS após 190 dias de cultivo pela técnica de FISH. (A e C) Células coradas com DAPI. (B e D) Células de bactérias anammox hibridadas com a sonda Amx 820 (específica para os gêneros *Candidatus* “Brocadia” e “Kuenenia”).

A técnica de FISH possui a vantagem de permitir a identificação de células quando as mesmas encontram-se ativas, uma vez que o princípio dessa técnica é baseado na hibridação de sondas fluorescentes específicas e complementares a regiões do RNAr 16S, importante componente estrutural dos ribossomos, sistema de síntese proteica das células.

A presença de bactérias anammox ativas aos 190 dias de operação do RBS, evidenciada pela técnica de FISH indica que a remoção de nitrogênio no reator estava ocorrendo realmente pela via da oxidação anaeróbia da amônia. Nos períodos próximos aos 190 dias de operação, quando foi retirada a amostra de biomassa para a análise de FISH, a remoção de amônia e nitrito no RBS foi elevada, chegando a 100% de eficiência para nitrito e 95% para amônia. Os resultados das análises químicas, aliado à análise de FISH indicam que o reator encontrava-se em plena atividade anammox nesse período.

5.5 Estimativa da quantidade de bactérias anammox por PCR em tempo real

Os resultados obtidos pela PCR em tempo real demonstraram um aumento considerável do número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox ao longo da operação do RBS, indicando que houve aumento da população dessas bactérias durante o experimento de enriquecimento e cultivo. As concentrações iniciais do gene RNAr 16s de bactérias anammox no tempo zero de operação do RBS (inóculo) foram iguais a $3,7 \times 10^5$ cópias.g⁻¹ de lodo. Após 110 dias, quando o reator já apresentava indícios de atividade anammox as concentrações passaram a ser $4,2 \times 10^9$ cópias.g⁻¹ de lodo. Aos 330 dias as concentrações de DNAr 16S foram máximas no RBS, alcançando $4,7 \times 10^{10}$ cópias.g⁻¹ de lodo e teve uma redução aos 370 dias, caindo para $2,9 \times 10^{10}$ cópias.g⁻¹ de lodo (Figura 5.19). Vale lembrar, que no tempo 370 dias o RBS estava sendo alimentado com fenol, o que pode ter contribuído para provocar tal redução na população de bactérias anammox. Entretanto, o fenol não foi capaz de eliminar totalmente as bactérias anammox do meio.

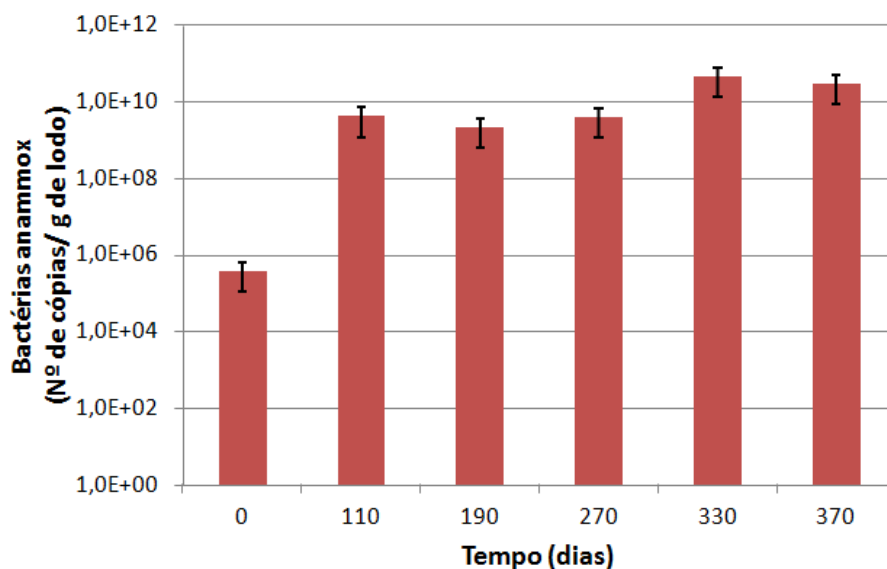


FIGURA 5.19 – Estimativa do número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox ao longo da operação do RBS

Ni *et al.* (2010) cultivando bactérias anammox em um reator em escala de bancada do tipo UASB encontrou concentrações máximas de RNAr 16S de bactérias anammox igual a $4,6 \times 10^8$ cópias.mL⁻¹ de lodo, resultado inferior ao obtido no presente estudo ($4,7 \times 10^{10}$ cópias.g⁻¹ de lodo). Essa concentração foi encontrada quando o reator apresentava melhor desempenho, aos 300 dias de operação, em que o mesmo era alimentado com concentrações de amônia e nitrito de aproximadamente 200 mg.L⁻¹ e era capaz de remover 94% do nitrogênio total afluente.

No presente trabalho, no tempo zero, quando as concentrações de DNAr 16S de anammox foi mais baixa ($3,7 \times 10^5$ cópias.g⁻¹ de lodo) o reator ainda não apresentava atividade anammox e ainda não era capaz de remover nitrogênio. Pelo contrário, as cargas efluentes de nitrogênio eram mais elevadas que as afluentes (Figura 5.20). Park *et al.* (2010) cultivando bactérias anammox em um RBS em escala laboratorial a partir de lodo proveniente de um reator anammox em escala real, relatou que a concentração do gene RNAr 16S de bactérias anammox foi, no início da operação do reator, próxima de 8×10^6 nº de cópias.ml⁻¹ de lodo, e que as cargas de nitrogênio removidas foram inicialmente baixas, não chegaram a ter valores negativos, mas foram próximas a zero em alguns momentos. Após 150 dias de operação, os autores perceberam a granulação da biomassa com mudança na coloração da mesma para um tom avermelhado, característico de bactérias anammox. Conseqüentemente houve uma

estabilização na quantidade de genes de bactérias anammox quantificada, que permaneceu entre $0,4$ a $7,8 \times 10^8$ cópias.mL⁻¹. A partir desse momento, o reator foi capaz de remover cargas de nitrogênio próximas a $400 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Na presente pesquisa, o reator foi capaz de remover cargas tão altas quanto as removidas no estudo de Park *et al.* (2010), alcançando $390 \text{ g N .m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, entretanto, nesse momento um número de cópias de RNAr 16S de bactérias anammox maior foi observado, sendo igual a $4,7 \times 10^{10}$ cópias.g⁻¹ de lodo (Figura 5.20).

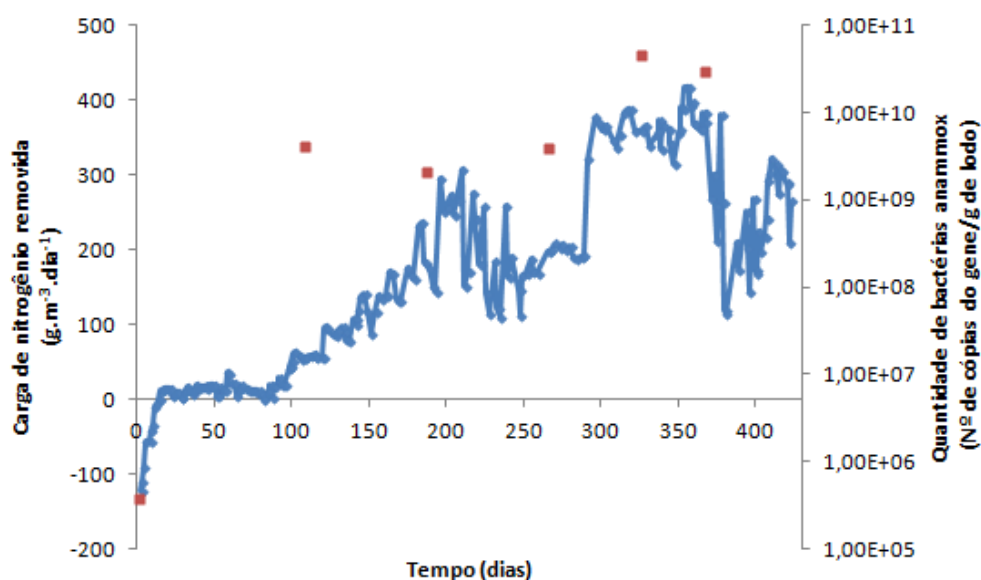


FIGURA 5.20 – Carga de nitrogênio removida no RBS (linha azul) e número de cópias de RNAr 16S de bactérias anammox (quadrados vermelhos) ao longo do tempo de operação.

Estimou-se também a abundância relativa do número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox em relação ao número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias totais. Os resultados são apresentados na Figura 5.21.

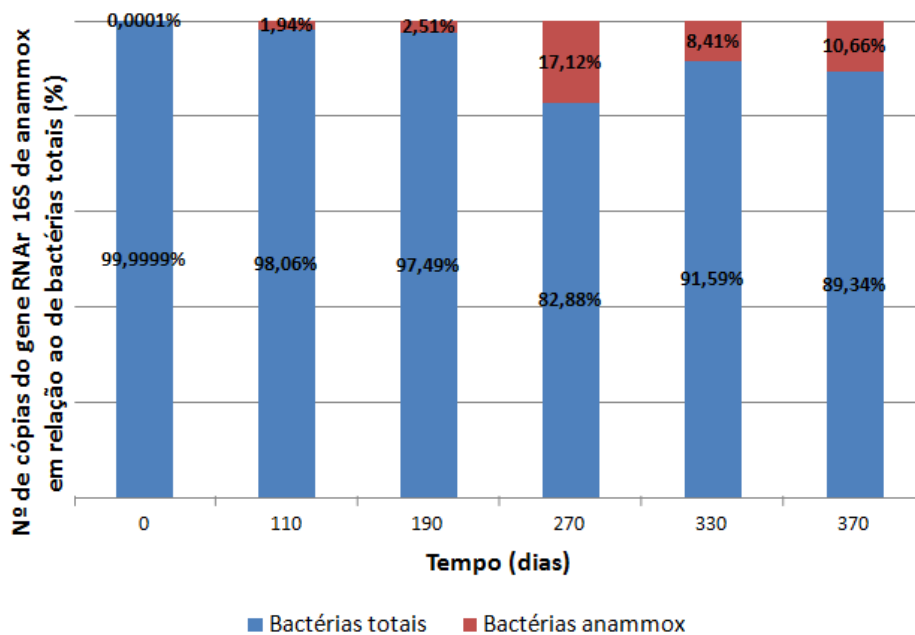


FIGURA 5.21 – Abundância relativa do número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias anammox em relação ao número de cópias do gene RNAr 16S de bactérias totais ao longo da operação do RBS.

Antes do enriquecimento (tempo 0) a porcentagem de DNAr 16S de bactérias anammox em relação a bactérias totais foi bastante pequena (0,0001%). Ao longo do tempo, a abundância relativa do gene de bactérias anammox foi aumentando, alcançando seu valor máximo com 270 dias de operação (17,12%). Nesse período o reator estava sendo alimentado com concentrações afluentes de amônia e nitrito próximas a 90 e 118 mg.L⁻¹, respectivamente, e apresentava boas eficiências de remoção de nitrito (99%) e de amônia (85 a 90%). No período subsequente (330 dias) observou-se que a porcentagem de DNAr 16S de anammox caiu em relação à bactérias totais (8,41%), entretanto, esta diminuição se deu pelo aumento do número de cópias de DNAr 16S de bactérias totais e não pela diminuição do número de cópias do DNAr 16S de bactérias anammox, como pode ser observado na Figura 5.19.

No período 370 dias, quando o reator estava sendo alimentado com fenol observou-se que, mesmo havendo uma diminuição no número de cópias do gene de bactérias anammox, houve um aumento da proporção relativa de anammox/ bactérias totais em relação ao período precedente (aumentou de 8,41% para 10,66%). Por esse motivo, é possível sugerir que o fenol pode ter exercido algum efeito tóxico sobre a população de bactérias em geral, eliminando do

meio não somente os organismos anaeróbios oxidadores de amônia, como também outros grupos de bactérias.

Proporção relativa maior (51%) do gene RNAr 16S de bactérias anammox em relação ao total de genes de RNAr 16S de bactérias foi encontrada por Quan *et al.* (2008), em um reator anaeróbio de fluxo ascendente operado em condições autotróficas, inoculado com sedimento de rio. A quantidade do gene RNAr 16S de bactérias anammox neste reator atingiu valor igual a $2,4 \times 10^{10}$ cópias. μg^{-1} de DNA extraído.

5.6 Análise do perfil da comunidade microbiana ao longo do tempo de operação do reator por PCR-DGGE

A Figura 5.22 apresenta os perfis de DGGE da comunidade microbiana obtidos para as amostras do inóculo e do RBS coletadas ao longo do tempo de operação. Os perfis populacionais obtidos foram comparados utilizando o programa *BioNumerics*, e a partir da análise realizada foi gerado um dendrograma indicando os coeficientes de similaridade entre os perfis resultantes (Figura 5.23).

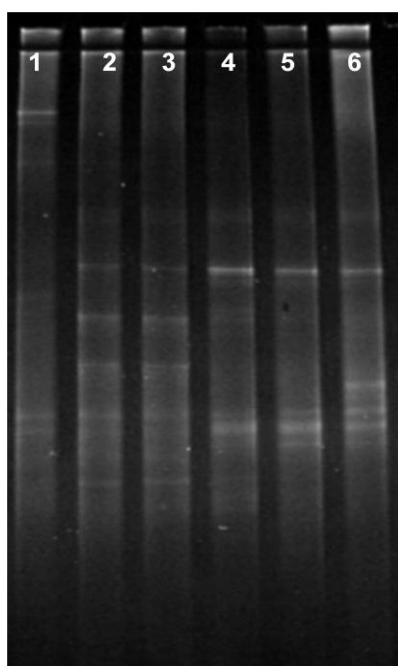


FIGURA 5.22 – Gel de DGGE contendo fragmentos de DNAr 16S amplificados com *primers* universais para bactérias em geral (1055F/1392R-GC). (1) Inóculo; (2) RBS 110 dias; (3) RBS 190 dias; (4) RBS 270 dias; (5) RBS 330 dias; (6) RBS 370 dias.

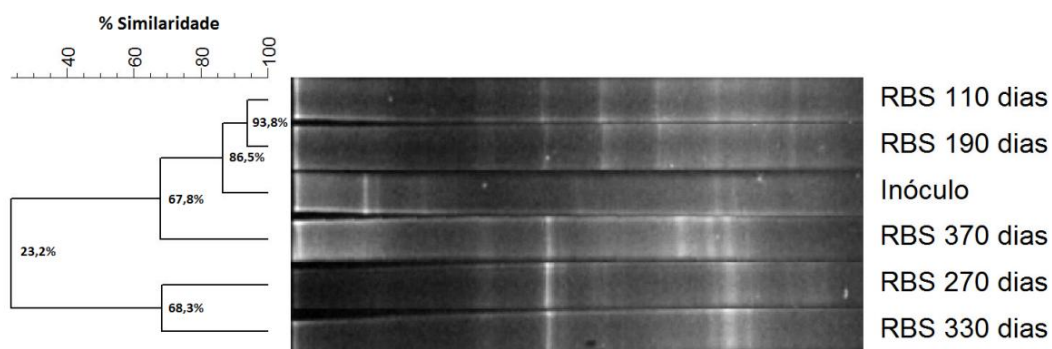


FIGURA 5.23 – Dendrograma obtido para os perfis de bandas do inóculo e RBS aos 110, 190, 270, 330 e 370 dias (coeficiente de correlação de Pearson e método de agrupamento UPGMA).

Dois agrupamentos principais foram observados. O primeiro, constituído pelas amostras do RBS 110 dias, 190 dias, inóculo e RBS 370 dias. O segundo, por sua vez, constituído pelas amostras 270 e 330 dias. O perfil de bandas do inóculo foi mais similar ao perfil obtido para as amostras do RBS aos 110 e 190 dias de operação (86,5%), mesmo assim, observou-se que houve uma mudança no perfil da comunidade após o início da atividade anammox no reator, o que pode ser evidenciado comparando-se as amostras do inóculo e do RBS com 110 dias de operação.

As amostras do RBS coletadas com 110 e 190 dias, por sua vez, foram muito similares entre si (93,8%). Entre esses períodos as condições operacionais do RBS (pH, temperatura, OD, TDH), foram bastante parecidas. Não obstante, houve um aumento nas cargas nitrogenadas aplicadas ao reator que era inicialmente igual a $60 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ aos 110 dias e passou a ser $180 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ aos 190 dias. Entretanto, o aumento da carga nitrogenada parece não ter refletido em uma mudança significativa na estrutura da comunidade microbiana.

Quando foram comparadas as amostras do RBS com 110 e 190 dias às amostras coletadas nos períodos subsequentes (RBS 270 e 330 dias) observou-se pequeno coeficiente de similaridade (23,2%), indicando que houve uma mudança considerável no perfil da comunidade microbiana entre esses períodos. Um fato que pode estar relacionado a essa mudança, foi um aumento nas concentrações afluentes dos compostos nitrogenados entre esses períodos, atingindo seus valores mais elevados no RBS (177 e 160 mg.L^{-1} para amônia e nitrito, respectivamente). Em consequência disso, foi verificada perda na eficiência de remoção de

nitrogênio no reator entre esses períodos, indicando que a atividade anammox foi afetada acarretando um aumento das concentrações afluentes dos compostos nitrogenados, o que eventualmente pode ter favorecido outros grupos microbianos presentes no reator.

Após a alimentação do reator com fenol (RBS 370 dias), foi verificado que o perfil da comunidade microbiana voltou a ser mais similar ao da amostra referente ao inóculo. Isso era esperado uma vez que a adição de fenol, que é um composto orgânico, ao reator pode ter favorecido o metabolismo heterotrófico, o qual possivelmente era predominante também no lodo de inóculo.

As bandas mais representativas obtidas nos perfis de DGGE foram recortadas do gel e sequenciadas (Figura 5.24). A identificação das bandas é apresentada na Tabela 5.4.

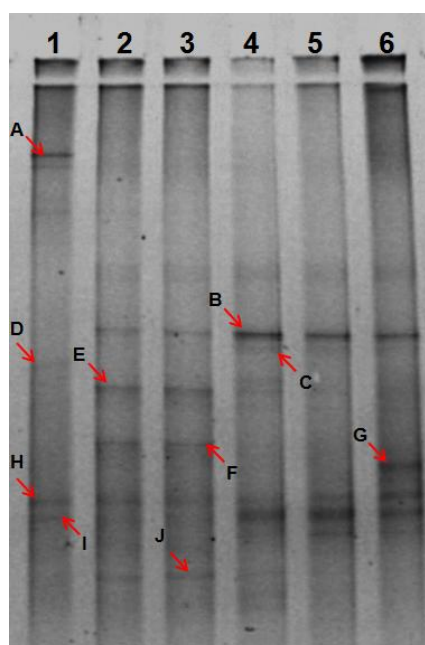


FIGURA 5.24 – Imagem invertida do gel de DGGE evidenciando as bandas que foram recortadas do gel e sequenciadas (setas vermelhas). (1) Inóculo; (2) RBS 110 dias; (3) RBS 190 dias; (4) RBS 270 dias; (5) RBS 330 dias; (6) RBS 370 dias.

TABELA 5.4 – Identificação das bandas do DGGE.

Banda	Filo	Classe ou Ordem mais próxima	Nº de acesso (GenBank)	Gene RNAr 16S	Similaridade ⁽¹⁾
A	<i>TM7</i> ⁽²⁾	-	AF269027	Bactéria não cultivada, clone NoosaAW40	92%
B	<i>Planctomycetes</i>	<i>Brocadiales</i>	AM285341	<i>Candidatus</i> “Brocadia sp. 40”, clone 40	99%
C	<i>Planctomycetes</i>	<i>Brocadiales</i>	DQ459989	<i>Candidatus</i> “Brocadia fulgida”	90%
D	<i>Proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	HQ149701	<i>Acidovorax ebreus</i> UTM FZZ15	94%
E	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	HQ085996	Bactéria não cultivada <i>Rhodocyclaceae</i> , clone F5OHPNU07HZUC0	93%
F	<i>Proteobacteria</i>	<i>Hydrogenophilaceae</i>	NR_074417	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC25259	99%
G	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	JQ832762	<i>Pseudomonas putida</i> p105_F05	87%
H	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	HQ834716	Bactéria não cultivada <i>Nitrosomonadaceae</i> , clone HKY02-06	90%
I	<i>Proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	AM084039	<i>Acidovorax</i> sp. R-25052	99%
J	<i>Proteobacteria</i>	<i>Mixococcales</i>	FJ889284	Bactéria não cultivada <i>Mixococcales</i> , clone Plot 18_G03	94%

(1) As porcentagens representam similaridade entre as sequências das bandas do DGGE com as sequências mais próximas no GenBank;

(2) Candidato à divisão TM7.

A identificação das bandas isoladas a partir do gel de DGGE revelou que a maioria das sequências obtidas está relacionada com microrganismos do Filo *Proteobacteria*. Também foram obtidas sequências relacionadas aos Filos *Planctomycetes* e TM7.

A Banda A, presente apenas no inóculo, parece estar relacionada a microrganismos da Divisão TM7. Sequências de DNAr 16S desse grupo já foram recuperadas a partir de sistemas de lodos ativados de estações de tratamento de efluentes, como é o caso do clone NoosaAW40, que apresentou similaridade (92%) com a sequência referente a Banda A, neste estudo. Conforme verificado por meio da técnica de FISH em estudos previamente realizados, esses microrganismos apresentam morfologia filamentosa, e tem sido apontada a sua relação com problemas de intumescimento do lodo (*bulking*) em sistemas de lodos ativados (HUGENHOLTZ *et al.*, 2001). A Banda H, que também apareceu no inóculo e parece ter se mantido em todas as amostras coletadas do RBS ao longo do tempo, teve identidade de 90% com sequências de bactérias da Família *Nitrosomonadaceae*. Esse grupo de microrganismos

inclui gêneros de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (MADIGAN *et al.*, 2010). Amônia foi um substrato adicionado ao reator ao longo de todo o tempo de operação, entretanto, além desse substrato, condições aeróbias são requeridas para a sobrevivência desse grupo de bactérias, e estas condições não eram predominantes no interior do RBS, o qual foi operado sob anaerobiose. Mesmo assim, pode ter ocorrido a presença de nichos aeróbios no RBS que possibilitaram a sobrevivência desse grupo ao longo do tempo de operação.

A Banda B foi predominante em todas as amostras coletadas ao longo do tempo de operação do RBS. A comparação da sequência referente a essa banda com as depositadas no *GenBank*, resultou em similaridade elevada (99%) com sequência de DNAr 16S de *Candidatus* “*Brocadia* sp. 40”. Esses resultados, mais uma vez, comprovam que o enriquecimento de microrganismos anammox foi realizado com sucesso. Além disso, as bactérias desse grupo permaneceram no RBS ao longo de todo o tempo de operação, inclusive após a adição de fenol ao reator (370 dias). Verificou-se que o fenol foi capaz de interferir na remoção de nitrogênio pelas bactérias anammox quando adicionado em concentrações elevadas (300 mg.L⁻¹), conforme foi discutido no item 5.2. No entanto, os resultados obtidos pela técnica da PCR-DGGE mostraram que a presença desse composto tóxico não foi capaz de eliminar do reator esse grupo de microrganismos. Além da Banda B, a Banda C, que esteve presente nas amostras do RBS após 270, 330 e 370 dias, também apresentou similaridade (90%) com sequência do gene RNAr 16S da bactéria anammox *Candidatus* “*Brocadia fulgida*”. Esse gênero de bactéria anammox é conhecido por sua capacidade de oxidar compostos orgânicos como o acetato, formato, propionato, monometilamina e dimetilamina com nitrito ou nitrato como aceptor de elétrons. No entanto, esses microrganismos não incorporam o carbono desses compostos orgânicos diretamente à biomassa celular, sua fonte de carbono é o CO₂. Estudos sugeriram que a oxidação dos compostos orgânicos pela bactéria *Candidatus* “*Brocadia fulgida*” ocorre somente para a conservação de energia, o que culminaria em uma maior produção de biomassa para as bactérias anammox por mol de amônia oxidada. Outra característica interessante desse gênero de anammox é a autofluorescência emitida quando esses microrganismos estão presentes em elevadas concentrações (KARTAL *et al.*, 2008).

A presença de bandas relacionadas a bactérias desnitrificantes também foi observada ao longo da operação do RBS. Algumas foram associadas à ordem *Burkholderiales* (Banda D, *Acidovorax ebreu*; Banda I *Acidovorax* sp.), microrganismos comumente encontrados em

sistemas de lodos ativados, e conhecidos por desempenhar importantes papéis na degradação de compostos aromáticos e na biorremediação de ambientes contaminados (HEYLEN *et al.*, 2006; QUINTAES *et al.*, 2012). O RNAr 16S da Banda E apresentou similaridade com o RNAr 16S de proteobactérias da Família *Rhodocyclaceae* a qual também realiza a desnitrificação e é encontrada em sistemas de lodos ativados (HEYLEN *et al.*, 2006). Além disso, foi obtida similaridade igual a 99% entre a sequência da Banda F e sequência do gene RNAr 16S de *Thiobacillus denitrificans*, proteobactéria quimiolitotrófica que cresce em condições anaeróbias utilizando o nitrato como aceptor de elétrons e é capaz de oxidar compostos de enxofre e ferro, entre outros, para obtenção de energia (LETAIN *et al.*, 2007).

A presença de bactérias desnitrificantes heterotróficas no RBS ao longo de todo o tempo de operação sugere que a ocorrência de desnitrificação heterotrófica após a alimentação do reator com fenol, possivelmente aconteceu, uma vez que o mesmo poderia servir como fonte de carbono orgânico para o metabolismo desses microrganismos. Observou-se que quando a concentração afluyente desse composto atingiu 300 mg.L^{-1} , houve um aumento no consumo de nitrito em relação à amônia, aumentando o coeficiente estequiométrico NO_2^- consumido/ NH_4^+ consumido, que era em média 1,16 e passou a ser 2,65, atingindo valores máximos de 4,25 (Tabela 5.3; Figura 5.14).

A rota da degradação anaeróbia de fenol por bactérias desnitrificantes pode ocorrer conforme mostrado na Figura 5.25. O primeiro passo para a degradação do fenol utilizando o nitrato como aceptor de elétrons é a carboxilação do fenol, produzindo 4-hidroxibenzoato e já foi estudado em bactérias do gênero *Pseudomonas* (TSCHEC & FUCHS, 2000). A rota de degradação do benzoato, por sua vez, passa por cinco fases, a saber: (1) tioesterificação da coA; (2) hidratação/ desoxigenação; (3) redução do anel; (4) quebra do anel; (5) β -oxidação da abertura do anel para acetil-coA (VAN SCHIE & YONG, 2000 *apud* OMENA, 2008).

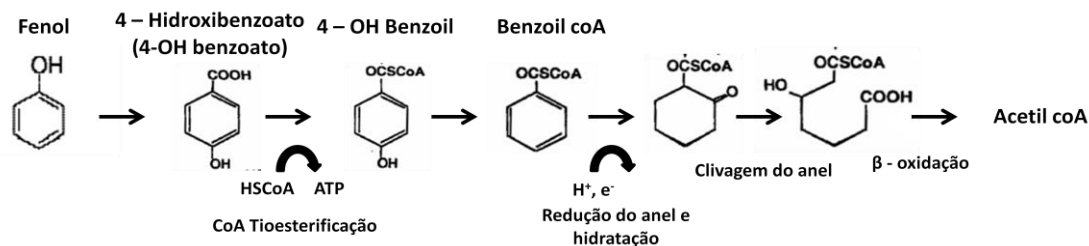


FIGURA 5.25 – Possível rota para degradação anaeróbica de fenol incluindo a degradação do benzoato.

Fonte: Adaptado de Omena, 2008.

Um fato interessante foi o surgimento da Banda G na amostra do RBS aos 370 dias de operação, após a alimentação do reator com fenol. O sequenciamento desta banda apontou similaridade (87%) com a sequência de RNAr 16S de *Pseudomonas putida*. Apesar de não ter sido um valor de similaridade muito alto, foi o maior valor encontrado quando a sequência foi comparada com as sequências depositadas no *GenBank*. Esse microrganismo tem sido associado à degradação de compostos fenólicos por diversos autores (ULLHYAN & GHOSH, 2012; EL-NAAS *et al.*, 2009; REARDON *et al.*, 2000; BANDYOPADHYAY *et al.*, 1998; ALLSOP *et al.*, 1993). *Pseudomonas putida* é um bastonete gram-negativo reconhecido por sua habilidade em degradar compostos aromáticos, e é amplamente utilizada em sistemas de tratamento de efluentes para a degradação de fenol, alcançando eficiências elevadas de remoção nestes sistemas (EL-NAAS *et al.*, 2009). Esse microrganismo, entretanto, é aeróbio estrito e pode ter se desenvolvido no RBS devido à ocorrência de nichos aeróbios no interior do mesmo.

A rota de degradação aeróbia de fenóis por *Pseudomonas putida* já foi estudada e acontece de acordo com os passos mostrados na Figura 5.26. Na presença de oxigênio, o fenol é convertido à catecol, que posteriormente, é clivado em posição adjacente aos dois grupos hidroxilas. A enzima catecol 2,3-dihidroxigenase transforma o catecol para 2-hidroxiácido e este produto final pode ser metabolizado posteriormente no ciclo do ácido cítrico (REARDON *et al.*, 2000).

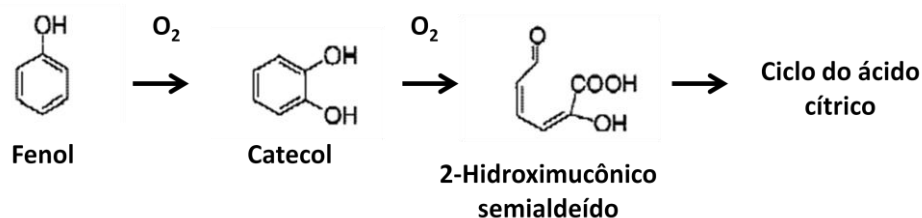


FIGURA 5.26 – Degradação aeróbia de fenol por *Pseudomonas putida*

Fonte: Adaptado de Reardon *et al.*, 2000.

A presença de bactérias anammox associadas a bactérias capazes de degradar compostos fenólicos, como *Pseudomonas putida* e bactérias desnitrificantes, em um mesmo reator, pode ser benéfica quando se objetiva o tratamento de efluentes que possuam nitrogênio amoniacal e compostos orgânicos tóxicos como os fenóis, como é o caso dos despejos de coqueria da indústria siderúrgica e dos efluentes da indústria petroquímica, por exemplo (JIN *et al.*, 2012). No presente trabalho, foi possível observar a coexistência desses grupos de microrganismos após a alimentação do reator com fenol (RBS 370 dias), sugerindo que a comunidade desenvolvida no RBS possui potencial para o tratamento desse tipo de despejo.

5.7 Análise da diversidade de microrganismos no RBS pela técnica de pirosequenciamento

Foram coletadas três amostras de DNA do RBS (110, 270 e 370 dias) com intuito de realizar a comparação da diversidade de microrganismos em diferentes tempos por pirosequenciamento. Optou-se por um período inicial, imediatamente após o início da atividade anammox (110 dias), um período intermediário (270 dias) e um período após o experimento de alimentação do reator com fenol (370 dias). São discutidos apenas os resultados referentes à amostra de biomassa do RBS com 270 dias de operação. Os resultados do pirosequenciamento das amostras dos períodos 110 e 370 dias não estavam disponíveis quando da conclusão deste trabalho.

O pirosequenciamento de tal amostra resultou em um total de 16.363 sequências. Desse total, foram selecionadas 4.156 sequências com tamanho variando de 140 a 240 pb, sendo que a maioria das sequências possuía tamanhos iguais a 220 e 230 pb (Figura 5.27).

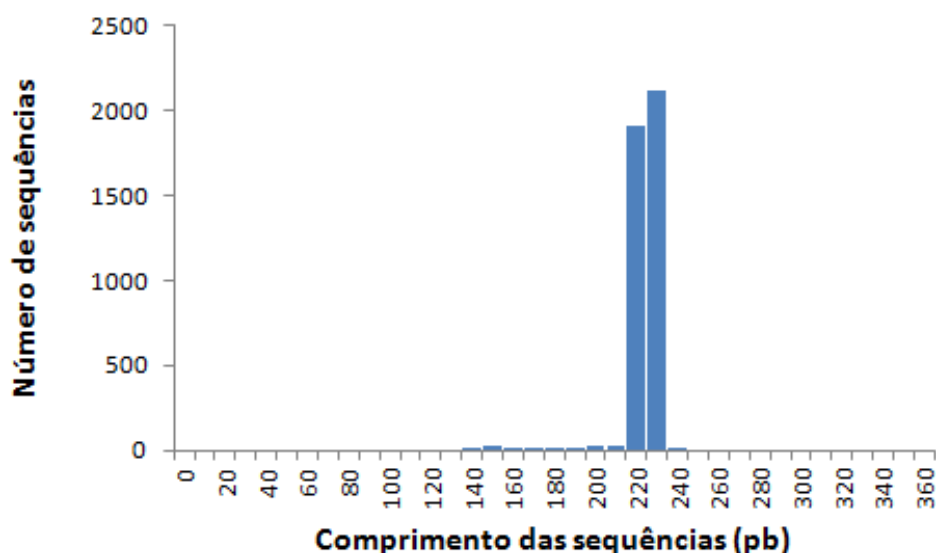


FIGURA 5.27 – Histograma da distribuição do comprimento das sequências obtidas.

As UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) foram definidas agrupando-se as sequências de acordo com a similaridade entre elas. Optou-se por trabalhar com as UTOs a um nível de similaridade igual a 97%, uma vez que sequências que apresentam similaridade igual ou superior a este valor podem ser consideradas como pertencentes à mesma espécie (GEVERS *et al.*, 2005). Como resultado, foi obtido um total de 318 UTOs.

Na tabela 5.5 são apresentados os índices de diversidade determinados no nível de 97% de similaridade para a amostra do RBS analisada.

TABELA 5.5 – Índices de diversidade determinados para a amostra analisada (97% de similaridade)

Índice	Valor
Dominância	0,038
Equitabilidade	0,72
Shannon	5,9
UTOs simples	125 (39%)
UTOs duplas	47 (15%)

O índice de equitabilidade expressa a maneira pela qual o número de indivíduos está distribuído entre diferentes espécies, ou seja, indica se as diferentes espécies possuem abundância (em termos de número de indivíduos) semelhantes ou divergentes (GOMES,

2004). A amostra analisada demonstrou alta variação na distribuição da comunidade microbiana, uma vez que apresentou valor relativamente próximo de 1 (0,72).

As medidas de diversidade levam em consideração tanto o número (riqueza) de espécies quanto a abundância relativa (equitabilidade) de cada uma delas. O índice mais utilizado para medir a diversidade em uma população é o índice de Shannon-Wiener (1949). A amostra estudada apresentou um índice de Shannon igual a 5,9. Este valor poderá ser utilizado posteriormente para a comparação com as demais amostras enviadas para o pirosequenciamento, a fim avaliar qual amostra apresenta maior diversidade. A diversidade de uma amostra tende a ser menor quanto menor for o índice de Shannon.

O índice de dominância apresentou um valor baixo (0,038) para a amostra do RBS com 270 dias de operação, indicando uma distribuição mais equânime dos táxons na comunidade microbiana da amostra analisada (valores próximos a zero indicam distribuição mais equânime dos táxons e valores mais próximos de 1 indicam o domínio de um táxon na comunidade microbiana). Este índice expressa o número de indivíduos de uma determinada espécie em relação ao número de indivíduos de todas as espécies encontradas.

5.7.1 Caracterização da diversidade microbiana

A classificação taxonômica das UTOs foi realizada por meio da ferramenta *RDP-Classififer*. Das 318 UTOs definidas (97% de similaridade) 304 foram classificadas em filós do domínio *Bacteria*. Observou-se um menor número de UTOs classificadas para os níveis de classe (291), ordem (234), família (160) e gênero (65) (Tabela 5.6).

TABELA 5.6 – Número de UTOs classificadas nos diferentes níveis taxonômicos e porcentagem em relação ao total de UTOs (97% de similaridade)

	Número de UTOs	Porcentagem em relação ao total de UTOs (%)
Filo	304	95,60
Classe	291	91,51
Ordem	234	73,58
Família	160	50,31
Gênero	65	20,44

5.7.1.1 Filos

Os principais filos observados na biomassa do RBS aos 270 dias de operação foram *Proteobacteria* (27,54%), *Chloroflexi* (19,11%), *Planctomycetes* (15,12%) e GN04 (15,09%). A abundância relativa dos filos mais representativos observados na amostra pesquisada é apresentada na Figura 5.28. Na Tabela 5.7 são listados todos os 24 filos observados e a abundância relativa de cada filo.

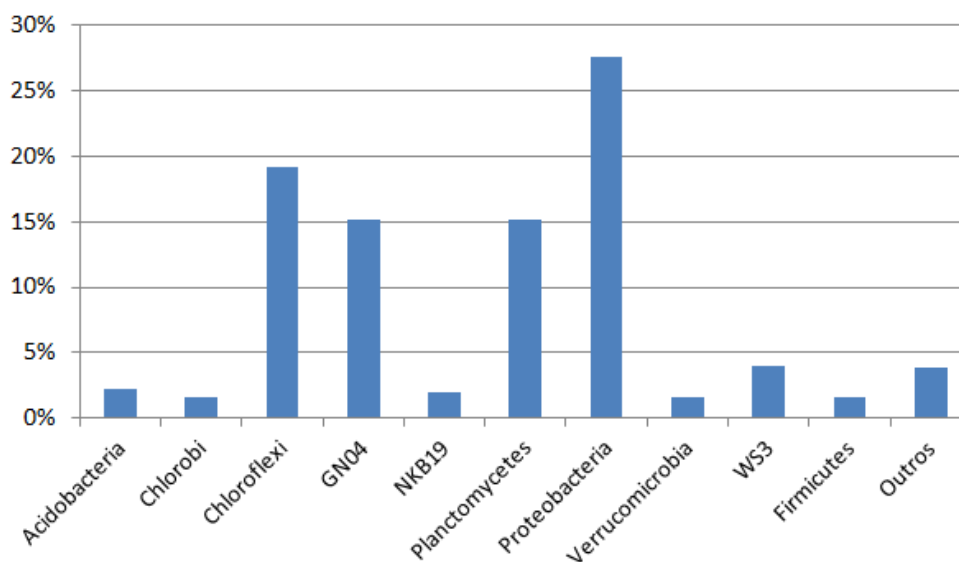


FIGURA 5.28 – Abundância relativa dos filos mais representativos na biomassa do RBS aos 270 dias de operação (97% de similaridade).

TABELA 5.7 – Abundância relativa de todos os filos observados na biomassa do RBS aos 270 dias de operação (97% de similaridade)

Filos do Domínio <i>Bacteria</i>	Abundância relativa (%)
<i>Acidobacteria</i>	2,29
<i>Actinobacteria</i>	0,72
<i>Armatimonadetes</i>	0,10
<i>BRC1</i>	0,94
<i>Bacteroidetes</i>	0,36
<i>Chlamydiae</i>	0,05
<i>Chlorobi</i>	1,61
<i>Chloroflexi</i>	19,11
<i>Cyanobactéria</i>	0,02
<i>Firmicutes</i>	1,56

/Continua

Filos do Domínio Bacteria	Abundância Relativa (%)
GN04	15,09
<i>Gemmatimonadetes</i>	0,41
<i>NC10</i>	0,20
<i>NKB19</i>	1,93
<i>Nitrospirae</i>	0,41
<i>OP11</i>	0,31
Planctomycetes	15,12
Proteobacteria	27,54
<i>Spirochaetes</i>	0,41
<i>TM7</i>	0,07
<i>Thermi</i>	0,05
<i>Verrucomicrobia</i>	1,66
<i>WS3</i>	3,95
Não classificados	6,23

O filo *Proteobacteria* é o maior e mais diverso grupo dentro do domínio *Bacteria*. Todos os microrganismos presentes nesse grupo são gram-negativos e exibem uma diversidade muito ampla de mecanismos de produção de energia, contendo espécies quimiolitotróficas, quimiorganotróficas e fototróficas. Possuem fisiologia diversa, incluindo formas anaeróbias, microaerófilas e aeróbias facultativas. Quanto à morfologia, também é muito variável entre as diferentes espécies, podendo possuir formas de bacilos retos e curvos, cocos, espirilos e formas com brotamento e apendiculadas (MADIGAN *et al.*, 2010). O grande número de microrganismos incluídos nesse filo, aliado a enorme diversidade e versatilidade metabólica de seus constituintes pode explicar a grande abundância relativa do mesmo no RBS.

O nome *Chloroflexi* foi proposto em substituição à nomenclatura do filo que inclui as bactérias anteriormente conhecidas com “*Green-non-sulfur*” (Bactérias verdes não sulfurosas). São organismos estritamente anaeróbios e fototróficos, filamentosos que podem ser encontrados em ambientes aquáticos que contenham enxofre elementar como águas termais e sedimentos de lagos e rios (SEVIOUR & BLACKALL, 1999 *apud* VAL-MORAES, 2008). Também são encontrados em estações de tratamento de esgotos, sendo muito comuns em sistemas de lodos ativados (KRAGELUND *et al.*, 2011). Isso pode justificar a presença de organismos desse filo na amostra pesquisada, uma vez que o inóculo utilizado para o enriquecimento de bactérias anammox foi justamente lodo ativado convencional de estação de tratamento de esgotos doméstico.

Outro táxon que foi bastante abundante na amostra analisada foi o GN04. Na verdade, os microrganismos que compõem esse filo são candidatos ao filo GN04. As informações sobre esse filo são escassas na literatura, ainda não existem representantes cultivados e não se tem informações sobre características fisiológicas e morfológicas dos organismos. No entanto, tem sido recuperadas sequências de DNA relacionadas a esse filo em amostras ambientais (<http://www.uniprot.org/taxonomy/363473>).

Observou-se que sequências relacionadas ao filo *Planctomyces* foram abundantes na biomassa do RBS. Nesse filo estão inseridas as bactérias anammox, de particular interesse para o presente trabalho. Os microrganismos deste filo possuem características fenotípicas muito peculiares dentro do domínio *Bacteria*, como ausência de peptidoglicano em suas paredes celulares e a presença de compartimentalização por meio de membranas internas. Os representantes do filo *Planctomyces* são ubíquos e já foram encontrados em uma ampla gama de ambientes, como por exemplo, solos, ambientes de água doce, sedimentos oceânicos e sistemas de tratamento de efluentes (FUERST & SAGULENKO, 2011). A presença de Planctomicetos na amostra analisada era esperada, uma vez que durante todo o experimento de enriquecimento no RBS foram fornecidas condições ideais (pH, temperatura, substratos para o crescimento, condições de anaerobiose) para o crescimento de bactérias anammox, componentes deste filo.

Martins (2010), estudando a diversidade de microrganismos em um RBS inoculado com lodo nitrificante de estação de tratamento de efluentes de indústria produtora de aminoácido, e operado sob condições anammox (autotróficas) observou após 450 dias de operação, a presença do filo beta-*Proteobacteria*, bactérias verdes sulfurosas do filo *Chlorobi*, filo *Nitrospira*, filo *Chloroflexi* e filo OP11 coexistindo com microrganismos do filo *Planctomyces*. A proporção relativa de cada filo não foi relatada pelo autor. Todos esses filamentos também foram detectados no presente trabalho. Tal fato sugere que a presença de outros grupos de microrganismos é importante para o desenvolvimento e manutenção das bactérias anammox em um reator, indicando que pode haver alguma interação sintrófica entre esses grupos de microrganismos. Por exemplo, sabe-se que os sulfetos causam efeito tóxico às bactérias anammox em baixas concentrações, 1 a 2 mM (DAPENA-MORA *et al.*, 2007). Assim, a presença de bactérias capazes de oxidar sulfeto a enxofre elementar, como as

bactérias verdes sulfurosas do filo *Chlorobi*, pode ser benéfica, uma vez que estes organismos são capazes de retirar esse composto do meio (TANG *et al.*, 2009).

5.7.1.2 Gêneros

A abundância relativa de gêneros classificados foi igual a 20,44%, ou seja, de um total de 318 UTOs definidas, apenas 65 foram classificadas até o nível de gênero (Tabela 5.6), sendo que foram identificados um total de 41 gêneros. Na Figura 5.29 são mostrados os gêneros mais representativos (com abundância relativa variando de 0,1% a 12,16%) identificados na amostra do RBS com 270 dias de operação. E na Tabela 5.8 são apresentados todos os gêneros identificados na amostra.

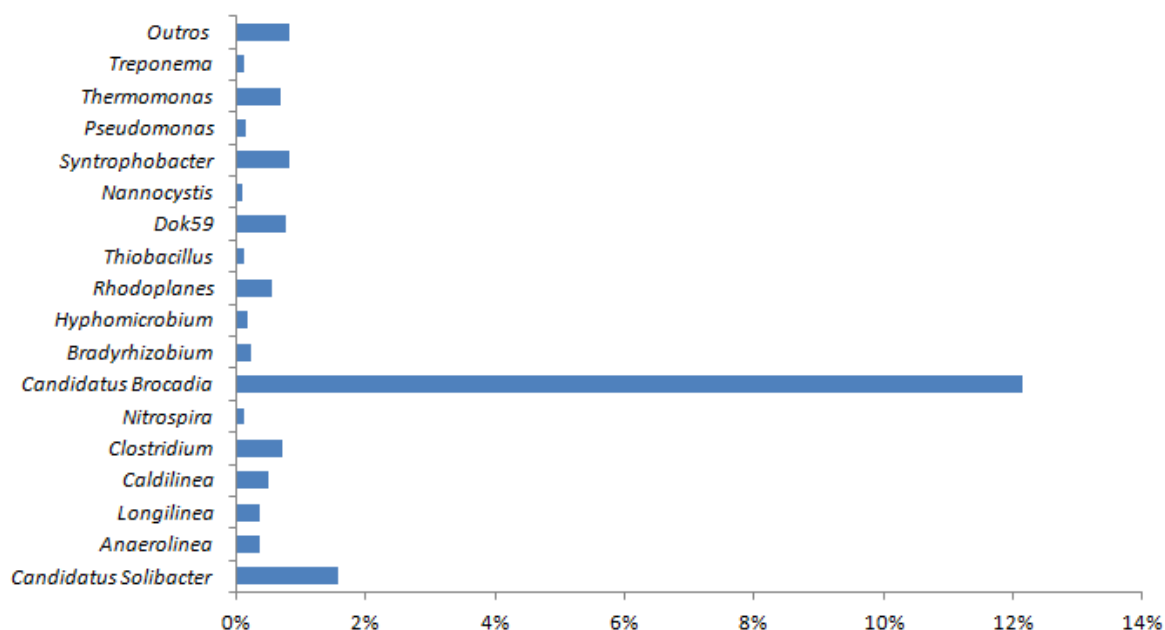


FIGURA 5.29 – Abundância relativa dos gêneros mais representativos observados na biomassa do RBS aos 270 dias de operação (97% de similaridade).

TABELA 5.8 - Abundância relativa de todos os gêneros observados na biomassa do RBS aos 270 dias de operação (97% de similaridade)

Gênero	Abundância relativa (%)
<i>Candidatus "Solibacter"</i>	1,56
<i>Mycobacterium</i>	0,02
<i>Candidatus "Protochlamydia"</i>	0,02
<i>Candidatus "Rhabdochlamydia"</i>	0,02
<i>Anaerolinea</i>	0,36
<i>Longilinea</i>	0,36
<i>SHD-231</i>	0,02
<i>T78</i>	0,02
<i>Caldilinea</i>	0,51
<i>Lactobacillus</i>	0,02
<i>Clostridium</i>	0,72
<i>Sarcina</i>	0,02
<i>Dehalobacter</i>	0,02
<i>Nitrospira</i>	0,12
<i>Planctomyces</i>	0,02
<i>Candidatus "Brocadia"</i>	12,16
<i>Caulobacter</i>	0,02
<i>Balneimonas</i>	0,07
<i>Bradyrhizobium</i>	0,22
<i>Ochrobactrum</i>	0,02
<i>Devosia</i>	0,02
<i>Hyphomicrobium</i>	0,17
<i>Pedomicrobium</i>	0,02
<i>Rhodoplanes</i>	0,55
<i>Blastochloris</i>	0,05
<i>Paracoccus</i>	0,02
<i>Telmatospirillum</i>	0,07
<i>Thiobacillus</i>	0,12
<i>Dok59</i>	0,77
<i>Bdellovibrio</i>	0,07
<i>Nannocystis</i>	0,1
<i>Sorangium</i>	0,02
<i>Syntrophobacter</i>	0,82
<i>Pseudomonas</i>	0,14

/Continua

Gênero	Abundância Relativa
<i>Steroidobacter</i>	0,05
<i>Dokdonella</i>	0,02
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,05
<i>Thermomonas</i>	0,67
<i>Treponema</i>	0,12
<i>Meiothermus</i>	0,05
<i>Prostheco bacter</i>	0,02
Não classificado	79,71

Em função da quantidade de gêneros encontrados na amostra (41) restringiu-se à descrição daqueles mais representativos, ou seja, aqueles que apresentaram maior abundância relativa (Tabela 5.9).

TABELA 5.9 – Descrição dos principais gêneros encontrados no RBS após 270 dias de operação

Gênero	Filo	Descrição	Referência
<i>Candidatus</i> Brocadia	Planctomycetes	Bactérias anammox pertencentes ao filo <i>Planctomycetes</i> , anaeróbios estritos, quimiolitotróficos, pH ótimo entre 6,7 e 8,3 e temperatura entre 20 e 43 °C. Obtém energia por meio da oxidação anaeróbia da amônia e carbono por meio da fixação de CO ₂ . Comumente encontradas em sistemas de tratamento de efluentes.	Strous <i>et al.</i> (1999b).
<i>Candidatus</i> Solibacter	<i>Acidobacteria</i>	Heterotróficos versáteis capazes de utilizar desde carboidratos simples aos mais complexos, como celulose, hemicelulose e quitina. Exibem baixas taxas metabólicas e são capazes de sobreviver em baixas concentrações de nutrientes. São capazes de reduzir nitrato ou nitrito, mas não fixam N ₂ e não realizam desnitrificação. Excretam proteínas importantes para a formação de biofilmes.	Ward <i>et al.</i> (2009).
<i>Syntrophobacter</i>	<i>Proteobacteria</i>	Microrganismos que degradam propionato em associação sintrófica com <i>Methanospirillum</i> ou <i>Methanobacterium</i> , utilizando hidrogênio ou formato para transferência de elétrons.	Worm <i>et al.</i> (2011).

/Continua

Gênero	Filo	Descrição	Referência
<i>Clostridium</i>	Firmicutes	Bacilos gram-positivos, usualmente móveis por meio de flagelos peritríquios. Formam esporos. A maioria é estritamente anaeróbia, porém algumas espécies são aerotolerantes. São quimiorganotróficos, sendo que algumas espécies são sacarolíticas ou proteolíticas ou ambos. Algumas fermentam açúcares, poliálcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos, purinas e outros compostos orgânicos. Algumas espécies fixam nitrogênio. São organismos ubíquos, podendo ser encontrados em solos, na água e no trato gastrointestinal de humanos e animais.	Buchanan & Gibbons (1974).
<i>Thermomonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	Células gram-negativas em forma de bastonetes com flagelos monotríquios. São aeróbios, porém podem crescer em condições anóxicas na presença de nitrato como acceptor de elétrons. Temperatura ótima de crescimento de 28 a 37 °C. A espécie <i>T. fusca</i> , foi isolada a partir de biofilmes crescendo em meio suporte de plástico em reatores desnitrificantes.	Megaert <i>et al.</i> (2003).
<i>Treponema</i>	<i>Spirochaetes</i>	Bacilos gram-negativos helicoidais móveis. São quimiorganotróficos, possuem metabolismo fermentativo, usando aminoácidos e/ou carboidratos. São estritamente anaeróbios. Habitam a cavidade oral, o trato intestinal e regiões genitais do homem e de animais.	Buchanan & Gibbons (1974).
<i>Thiobacillus</i>	<i>Proteobacteria</i>	Bacétrias gram-negativas, em forma de bastonetes, móveis devido a um único flagelo polar. A energia para o crescimento é derivada da oxidação de um ou mais compostos sulfúricos reduzidos ou parcialmente reduzidos, incluindo sulfetos, enxofre elementar, tiosulfato, sulfito, entre outros. São autotróficos e algumas espécies como <i>T. denitrificans</i> crescem anaerobiamente com nitrato como acceptor de elétrons. A temperatura ótima de crescimento é 28-30 °C e a faixa de pH é extremamente ampla.	Buchanan & Gibbons (1974).

/ Continua

Gênero	Filo	Descrição	Referência
<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	Bastonetes gram-negativos com flagelo polar único. Algumas espécies como a <i>P. stutzeri</i> são capazes de realizar a desnitrificação. Capazes de sobreviver em amplas faixas de temperatura (4 a 55 °C). Essa espécie é capaz de crescer em meios com amônia e nitrato e uma única molécula orgânica como fonte de energia e carbono. Algumas espécies, como <i>P. putida</i> , <i>P. aeuroginosa</i> , <i>P. fluorescência</i> , <i>P. pseudomallei</i> é capaz de degradar compostos fenólicos. Grande parte das espécies é anaeróbia facultativa, utilizando oxigênio quando presente, porém pode utilizar nitrato como acceptor de elétrons na ausência de oxigênio realizando a desnitrificação, neste caso. Já foi encontrada em solos, águas subterrâneas, águas e sedimentos marinhos e em estações de tratamento de efluentes.	Lalucat <i>et al.</i> (2006); Agarri <i>et al.</i> (2008); Afzal <i>et al.</i> (2007); Allsop <i>et al.</i> (1993).
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirae</i>	As células são bacilos gram-negativos retos e delgados. Não móveis. São obrigatoriamente quimiolitotróficos, oxidam nitrito a nitrato e fixam CO ₂ para suprimir seus requisitos de energia e carbono. São aeróbios estritos. A temperatura ótima para o crescimento é de 20 a 30 °C e o pH entre 7 e 8. O gênero <i>Nitrospira</i> é encontrado em ambientes marinhos e hoje é sabido que também está presente em muitos ambientes onde bactérias nitrificantes do filo <i>Proteobacteria</i> , como <i>Nitrosomonas</i> são encontradas. Inclusive, tem-se sugerido que a maior parte do NO ₂ ⁻ oxidado em ambientes naturais onde a nitrificação é um processo significativo, como em estações de tratamento de efluentes, é decorrente da atividade de <i>Nitrospira</i> .	Buchanan & Gibbons (1974); Madigan <i>et al.</i> (2010).
<i>Nannocystis</i>	<i>Proteobacteria</i>	As células vegetativas possuem forma de bastonetes com as extremidades arredondadas. Formam mixósporos esféricos e corpos de frutificação são cistos solitários com parede firme. São organotróficos capazes de degradar compostos orgânicos complexos. Já foi isolado de vários tipos de solos.	Reichenbach (1970).

/ Continua

Gênero	Filo	Descrição	Referência
<i>Rhodoplanes</i>	<i>Proteobacteria</i>	Células gram-negativas em forma de bastonetes, móveis por um único flagelo polar. São mesofílicos (crescimento ótimo a 25-30 °C) e a faixa de pH ótima é de 6-7,5. Possuem membranas fotossintéticas intracitoplasmáticas do tipo lamelar. Podem crescer em condições anaeróbias foto-organoheterotróficas ou em condições aeróbias quimiorganotróficas. Também são capazes de crescimento quimiorganotrófico, realizando desnitrificação em condições anóxicas na presença de nitrato quando na ausência de luz. Utilizam amônia como fonte de nitrogênio. Já foram isolados de água doce, solos e de lodo ativado de estação de tratamento de esgotos.	Okamura <i>et al.</i> (2009); Lakshmi <i>et al.</i> (2009).
<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Proteobacteria</i>	São bactérias metilotróficas, ou seja, utilizam substratos de carbono reduzidos, ou seja, sem ligação C-C, como metano, metilamina, metanol e enxofre metilado. Metabolismo quimiorganotrófico. São capazes de realizar a desnitrificação heterotrófica em presença de nitrato. Utilizam amônia e nitrato como fonte de nitrogênio. Temperatura ótima de crescimento entre 20 e 30 °C e pH ótimo neutro ou ligeiramente alcalino.	Lemmer <i>et al.</i> (1997); Isaka <i>et al.</i> (2012).
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Proteobacteria</i>	São bactérias capazes de fixar nitrogênio em associação simbiótica com raízes de plantas leguminosas. Além da fixação de N ₂ essas bactérias podem realizar em baixas concentrações de oxigênio a desnitrificação, reduzindo nitrato ou nitrito a nitrogênio gasoso.	Sánchez <i>et al.</i> (2011).

/Continua

Gênero	Filo	Descrição	Referência
<i>Caldilinea</i>	<i>Chloroflexi</i>	Células em formato filamentosos que podem crescer em temperaturas variando de 37-65 °C (temperatura ótima 55 °C), e pH entre 7,5-8,5. Pode crescer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, e utilizar uma ampla gama de substratos orgânicos para a obtenção de energia. É abundante em sistemas de lodos ativados de estações de tratamento de efluentes, e exercem papel importante na estrutura dos flocos comumente formados em sistemas de lodos ativados.	Sekigushi <i>et al.</i> (2003); Kragelund <i>et al.</i> (2011).
<i>Longilinea</i>	<i>Chloroflexi</i>	Célula com formato filamentosos, não móvel, gram-negativa. São anaeróbios estritos, organotróficos, podendo utilizar proteínas e carboidratos como fonte de energia. Temperatura de crescimento entre 30 e 40 °C e faixa de pH 5-8,5 (Temperatura e pH ótimos 55 °C e 7,0, respectivamente). São ubíquos, já foram encontrados em solos, fontes termais e lodo aeróbio e anaeróbio.	Yamada <i>et al.</i> (2007).
<i>Anaerolinea</i>	<i>Chloroflexi</i>	Bactéria filamentosos, gram-negativa. Crescem sob condições estritamente anaeróbias, são organotróficos, podendo utilizar uma ampla gama de carboidratos como fonte de energia. São termofílicas, com crescimento ótimo entre 55 e 60 °C. Faixa de pH entre 6-8. Também podem ser encontradas em solos, fontes termais e lodo aeróbio e anaeróbio.	Sekigushi <i>et al.</i> (2003);
<i>Dok59</i>	<i>Proteobacteria</i>	Organismos da família <i>Rhodocyclaceae</i> , a qual possui membros já enriquecidos a partir de lodos ativados de estações de tratamento de efluentes e envolvidos na remoção de fósforo.	Zilles <i>et al.</i> (2002)

O estudo da composição da comunidade microbiana no RBS aos 270 dias de operação pelo pirosequenciamento permitiu a confirmação da presença de bactérias anammox, mais especificamente do gênero *Candidatus* “Brocadia”, indicando mais uma vez, que o enriquecimento desses microrganismos a partir de lodos ativados de estação de tratamento de efluentes foi possível. Os resultados do pirosequenciamento foram condizentes com os obtidos pelas demais técnicas moleculares utilizadas neste trabalho (PCR, FISH, PCR em

tempo real, PCR-DGGE), as quais também confirmaram o sucesso do enriquecimento das bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia. Apesar da limitada representatividade das UTOs classificadas em nível de gênero (apenas 20,44%), foi observada uma abundância relativa muito superior de bactérias do gênero *Candidatus Brocadia* (12,16%) em relação aos demais gêneros classificados (Figura 5.28). Nesse período (270 dias) verificou-se por PCR em tempo real uma relação entre o RNAr 16S de bactérias anammox/ RNAr 16S de bactérias totais igual a 17,12%, abundância relativa próxima à obtida pelo pirosequenciamento (12,16%), embora sejam técnicas bastante diferentes. A presença abundante do DNAr 16S de bactérias anammox, aliado aos resultados físico-químicos, permitem afirmar que o RBS encontrava-se em plena atividade anammox aos 270 dias de operação. Vale lembrar que, nesse tempo o reator apresentava boa remoção de nitrogênio com eficiências próximas a 90%, sendo que era aplicado ao mesmo uma carga nitrogenada (amônia mais nitrito) de aproximadamente 220 g N.m⁻³.d⁻¹.

Os principais gêneros de bactérias anammox enriquecidos a partir de lodos ativados são, geralmente, *Candidatus “Brocadia”* e *Candidatus “Kuenenia”*, embora já tenha sido reportado também o enriquecimento de outros gêneros como *Candidatus “Anammoxoglobus”* e *Candidatus “Jettenia”* (KARTAL *et al.*, 2012). Alguns autores relatam o enriquecimento simultâneo de dois gêneros de anammox em um mesmo reator (CAMPOS, 2011; MARTINS *et al.*, 2010; VAN DER STAR *et al.*, 2008).

Campos (2011) que enriqueceu bactérias anammox a partir de lodo ativado em RBS semelhante ao utilizado no presente trabalho, verificou a presença de *Candidatus “Brocadia”* no início do cultivo. Porém, a população desse gênero de bactérias tendeu a diminuir ao longo do tempo e em contrapartida, outro gênero, *Candidatus “Kuenenia”*, passou a ser detectado na amostra após 202 dias de operação do reator. Entretanto, o gênero *Candidatus “Brocadia”* foi dominante durante todo o experimento de cultivo.

Van der Star *et al.* (2008) também enriqueceram simultaneamente *Candidatus “Brocadia”* e *Candidatus “Kuenenia”* e observou mudança na dominância do primeiro gênero para o segundo, ao longo do tempo de operação. Foi sugerido que *Brocadia* seria uma bactéria “r” estrategista, por possuir maior taxa de crescimento e *Kuenenia* seria uma bactéria “k” estrategista, devido à sua maior afinidade com o substrato limitante, que neste caso foi o nitrito. Martins (2010) utilizando RBS para o enriquecimento de anammox observou aos 170

dias de operação a presença de *Candidatus* “*Anammoxoglobus propionicus*” e de *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”, porém a segunda espécie foi dominante. E, ao analisar novamente a diversidade microbiana da biomassa cultivada aos 450 dias de operação, não encontrou organismos da espécie *Candidatus* “*Anammoxoglobus propionicus*”.

Date *et al.* (2009) enriqueceu anammox a partir de três tipos de lodo de estação de tratamento de efluentes em reatores de leito fixo em escala laboratorial. Quando utilizou como inóculo lodo bruto de estação de tratamento de efluentes, verificou o enriquecimento de duas espécies de anammox: *Candidatus* “*Brocadia fulgida*” e *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”. Quando utilizou como inóculo lodo digerido e lodo após nitrificação, verificou a predominância de uma só espécie na cultura enriquecida *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”. Os autores concluíram que a espécie de anammox predominante na cultura enriquecida depende do inóculo utilizado. Neste experimento de enriquecimento, assim como no presente trabalho foi observada a predominância do gênero *Candidatus* “*Brocadia*”.

Com relação aos demais organismos encontrados na biomassa do RBS aos 270 dias de operação, destaca-se a presença de vários gêneros capazes de realizar a desnitrificação heterotrófica quando em condições anóxicas (*Thermomonas*, *Pseudomonas*, *Rhodoplanes*, *Hyphomicrobium*, *Bradyrizobium*). Entretanto, o RBS até 270 dias era operado em condições autotróficas, ou seja, sem adição de matéria orgânica. Por esse motivo, sugere-se que a manutenção desses microrganismos no reator só foi possível devido à presença de matéria orgânica proveniente da degradação da biomassa endógena, existente no próprio reator, ou de compostos orgânicos liberados no meio, provenientes do metabolismo celular endógeno. Alguns desses produtos, denominados SMPs (*Soluble Microbial Products* ou Produtos microbianos solúveis) já foram caracterizados e verificou-se que podem ser constituídos por uma ampla gama de compostos orgânicos, como ácidos húmicos e fúlvicos, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos, aminoácidos, enzimas extracelulares, componentes estruturais das células e produtos do metabolismo energético dos microrganismos (BARKER & STUCKEY, 1999).

Apesar da presença de organismos desnitrificantes, a ocorrência da desnitrificação, desde o início da fase III (90 dias) até 335 dias de operação (antes da alimentação do reator com fenol) pode ter ocorrido, porém em níveis não significativos, uma vez que nenhuma fonte de matéria orgânica externa foi adicionada ao reator nesse período. Essa afirmação é corroborada pelos

resultados das análises químicas, que demonstram o consumo simultâneo de nitrito e amônio e a produção de nitrato em proporções estequiométricas próximas às relatadas na literatura para a reação anammox (consumo NO_2^- / consumo NH_4^+ médio igual a 1,16 e produção de NO_3^- / consumo NH_4^+ médio igual a 0,33 para o ciclo longo; Tabela 5.1). Ou seja, provavelmente não houve consumo de nitrito significativo por bactérias desnitrificantes. A presença de grupos de microrganismos desnitrificantes também foi observada pela técnica da PCR-DGGE, em todos os tempos de operação, conforme discutido anteriormente. Martins (2010) também verificou a ocorrência de bactérias desnitrificantes (*Pseudomonas* sp. e *Comamonas terrigena*), em RBS anammox operado sob condições anóxicas.

Um gênero de bactéria nitrificante oxidadora de NO_2^- , *Nitrospira*, também foi encontrado, embora em pequena proporção (0,10%) no RBS. Esse gênero de bactérias caracteriza-se por ser aeróbio estrito (BUCHANAN & GIBBONS, 1974), e por esse motivo, mais uma vez é sugerida a possibilidade de nichos aeróbios no interior do reator, apesar de todos os cuidados tomados para que condições anaeróbias prevalecessem no mesmo. A presença dessas bactérias poderia explicar o coeficiente estequiométrico para a produção de NO_3^- / consumo de NH_4^+ um pouco maior encontrado no presente estudo, em média 0,33 para o ciclo longo (16 horas) e 0,39 para o ciclo curto (8 horas). Entretanto, maiores investigações seriam necessárias para que essa hipótese fosse confirmada. Esse gênero de bactérias também foi encontrado por Martins (2010) coexistindo com bactérias anammox em RBS operado sob condições anóxicas.

Sequências relacionadas a bactérias filamentosas do filo *Chloroflexi* (gêneros *Anaerolinea*, *Longilinea* e *Caldilinea*) também foram encontradas no RBS. A presença dessas bactérias filamentosas pode ter exercido papel importante na formação estrutural de biofilmes na parede do RBS e também na formação de grânulos que foram observados a partir de 150 dias de operação (Figura 5.15). Egli *et al.* (2003) estudando a composição de um biofilme formado em reatores com biodiscos tratando lixiviado de aterro de resíduos industriais perigosos na Suíça, verificou a presença de bactérias filamentosas, além de bactérias anammox e nitrificantes no biofilme formado. Foi visto que as bactérias filamentosas presentes, exerciam um papel estrutural importante para a formação do biofilme. Martins (2010) também relatou a presença de bactérias da espécie *Anaerolinea thermophila* e *Caldilinea aerophila* em RBS sob condições anóxicas. O autor ressaltou que, por serem microrganismos heterotróficos, a

sobrevivência dos mesmos no reator só foi possível devido à presença de ácidos orgânicos de cadeia curta oriundos da decomposição da biomassa endógena.

Cho *et al.* (2010), investigando a comunidade microbiana em um reator anammox de fluxo ascendente e biomassa granular, também observaram que bactérias filamentosas do filo *Chloroflexi* estiveram presentes e participaram da estrutura dos grânulos formados. Bactérias desse filo são comumente encontradas em reatores anammox. Segundo os autores supracitados, esta coexistência parece estar relacionada à compatibilidade destes dois grupos de microrganismos, com ambientes ricos em amônio e nitrito, oligotróficos e anaeróbios.

5.7.2 Análise filogenética das UTOs relacionadas a bactérias anammox

Para a construção da árvore filogenética foram consideradas as sequências representativas das UTOs relacionadas a bactérias anammox, com tamanho maior que 220 nucleotídeos (UTO148, UTO 49, UTO 90 e UTO 221) (Figura 5.30). No total foram obtidas cinco UTOs relacionadas a bactérias anammox, entretanto, a UTO 80 não foi considerada para a construção da árvore filogenética, uma vez que era constituída de apenas uma sequência, a qual apresentou um tamanho consideravelmente menor em relação às outras UTOs consideradas. Na Tabela 5.10 são apresentadas as UTOs relacionadas a bactérias anammox, bem como a quantidade de sequências e o tamanho da sequência representativa para cada UTO.

TABELA 5.10 – UTOs relacionadas a bactérias anammox obtidas pela técnica de pirosequenciamento

UTO	Quantidade de sequências	Tamanho da sequência representativa (pb)
49	8	228
80	1	162
90	277	231
148	210	230
221	9	231

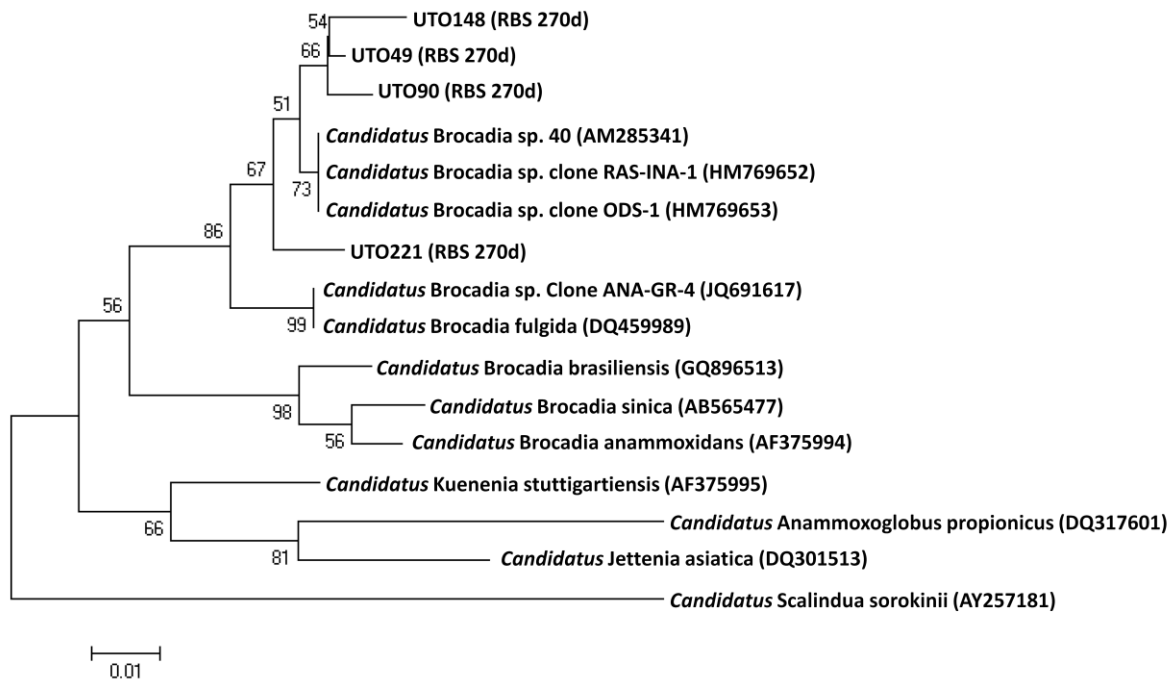


FIGURA 5.30 – Árvore filogenética apresentando a posição das UTOs relacionadas à bactérias anammox obtidas pelo pirosequenciamento da amostra de biomassa do RBS coletada aos 270 dias de operação. Os números nos nós da árvore representam a porcentagem de recuperação dos braços relevantes em 1000 análises de reamostragem por *Bootstrap*. Os números de acesso das sequências depositadas no *GenBank* estão indicadas entre parênteses. A barra de escala (0,01) representa uma modificação a cada 100 nucleotídeos.

As UTOs obtidas neste estudo aos 270 dias de operação do RBS apresentaram maior proximidade à *Candidatus* “*Brocadia* sp. 40”, clone 40, recuperado de um reator anammox em escala laboratorial inoculado com lodo nitrificante. As sequências representativas das UTOs 148, 49, 90 e 221 apresentaram similaridades iguais a, respectivamente, 98,5%, 99,3%, 98,8% e 98,5% com a sequência do referido clone (nº de acesso no *GenBank*: AM285341). Os resultados da análise filogenética confirmam os resultados obtidos pela técnica de PCR-DGGE, pelos quais foi possível observar uma banda que predominou no gel de DGGE ao longo de todo o tempo de operação, a qual apresentou elevada identidade (99%) com *Candidatus* “*Brocadia* sp. 40”.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que, a utilização de lodo ativado proveniente de estação de tratamento de esgotos domésticos foi adequada para a obtenção de biomassa anammox capaz de promover a remoção de nitrogênio amoniacal de efluente sintético, de maneira eficiente, em um reator em escala de bancada operado em bateladas sequenciais. Atividade anammox foi obtida após 90 dias de operação do reator sob condições autotróficas e predominantemente anaeróbias, sendo que após esse período, as médias da eficiência de remoção de amônia e nitrito foram próximas a 75 e 90%, respectivamente, e o reator foi capaz de remover cargas de nitrogênio (amônia mais nitrito) iguais a $390 \text{ g N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, alcançando, em geral, bom desempenho na remoção desse composto. Entretanto, foi verificado que quando concentrações elevadas de nitrogênio amoniacal e nitroso foram aplicadas ao reator (acima de 160 mg.L^{-1}), houve a diminuição da eficiência de remoção dos compostos nitrogenados, corroborando com dados da literatura, os quais apontam que concentrações muito elevadas dos próprios substratos utilizados pelas bactérias anammox são capazes de prejudicar sua atividade.

Os resultados dos testes de alimentação do reator com fenol demonstraram que aparentemente, concentrações tão altas quanto 200 mg.L^{-1} desse composto não foi capaz de inibir a atividade das bactérias anammox. Entretanto, quando concentração igual a 300 mg.L^{-1} foi adicionada ao reator, houve perda da eficiência de remoção de amônia e nitrito, as quais foram reduzidas em 48 e 15%, respectivamente, e aumento do consumo de nitrito em relação à amônia, sugerindo a ocorrência de desnitrificação heterotrófica no RBS após adição de fenol. Os resultados obtidos demonstraram que a cultura de bactérias anammox foi capaz de suportar concentrações relativamente elevadas desse composto sugerindo que o processo anammox tem potencial para o tratamento de efluentes que contenham fenol em sua constituição. Entretanto, para sua aplicação em efluentes reais, recomendam-se maiores investigações.

Todos os resultados obtidos pelas técnicas de biologia molecular aplicadas neste trabalho contribuíram para confirmar a presença de bactérias anammox no RBS, corroborando assim, com os resultados físico-químicos, os quais evidenciaram fortemente que a remoção de nitrogênio no reator foi predominantemente pela via da oxidação anaeróbia da amônia.

Bactérias anammox foram detectadas pela PCR com iniciadores específicos em todas as amostras de biomassa coletadas do RBS em diferentes tempos de operação. Pela técnica de FISH, foi possível observar a morfologia das células cultivadas no RBS, com aparência cocóide, tamanho de aproximadamente 1 µm e presença do anammoxossomo no interior do citoplasma celular.

A análise do perfil da comunidade microbiana ao longo do tempo de operação do RBS demonstrou que as bactérias anammox foram capazes de persistir ao longo de todo o período experimental. Além disso, alguns grupos de bactérias desnitrificantes foram detectados conjuntamente com bactérias anammox no RBS mesmo após a adição de fenol, o que oferece consistência à hipótese de que, após a adição de fenol ao reator, esse composto pode ter servido como fonte de matéria orgânica para os microrganismos que possuem metabolismo heterotrófico. A presença de microrganismos nitrificantes e de bactérias aeróbias envolvidas na degradação de fenol também foi detectada no reator, o que indica que apesar das condições predominantemente anaeróbias, a presença de nichos aeróbios no RBS pode ter permitido o desenvolvimento desses microrganismos.

Foi verificado, pela PCR em tempo real, que a população de bactérias anammox cresceu consideravelmente ao longo do experimento de enriquecimento e cultivo, evidenciado pela concentração de RNAr 16S que aumentou de 10^5 a 10^{10} número de cópias.g⁻¹ de lodo. Após a alimentação do reator com fenol, houve uma diminuição na concentração de RNAr 16S de bactérias anammox em relação ao período precedente, porém as concentrações ainda continuaram elevadas no RBS.

A análise da comunidade microbiana do RBS aos 270 dias de operação pelo pirosequenciamento demonstrou grande diversidade de bactérias no RBS. Entretanto, a abundância relativa de bactérias anammox foi igual a 12,16%, elevada em relação a outros gêneros de microrganismos identificados. Foi verificado que as bactérias anammox no RBS pertencem ao gênero *Candidatus* “Brocadia” e a análise filogenética demonstrou que esses microrganismos estão mais proximamente relacionados à *Candidatus* “Brocadia sp. 40”. Além de bactérias anammox foi observada a presença de gêneros de organismos desnitrificantes, aeróbios oxidadores de nitrito e bactérias filamentosas do filo *Chloroflexi*, entre outros grupos. A investigação de outros grupos bacterianos capazes de sobreviver concomitantemente com bactérias anammox sob condições anóxicas é interessante para a

aplicação do processo, uma vez que, conhecendo tais microrganismos e seus diferentes requisitos metabólicos, é possível fornecer condições ideais para seu crescimento em conjunto com as bactérias anammox, caso sejam convenientes para a melhoria do processo, ou evitar seu crescimento, caso sejam prejudiciais ao processo de oxidação anaeróbia da amônia.

7 RECOMENDAÇÕES

A partir dos resultados obtidos e com base nas dificuldades e limitações identificadas no presente trabalho, recomenda-se:

- Realizar novamente os testes de alimentação do reator com fenol analisando as concentrações afluentes e efluentes desse composto, a fim de confirmar se o mesmo foi degradado por algum grupo de microrganismo cultivado concomitantemente com bactérias anammox (bactérias desnitrificantes, por exemplo).
- Investigar a toxicidade de outros compostos comumente presentes em efluentes industriais que contenham elevadas concentrações de amônia (por exemplo, sulfetos, fosfatos, cianetos, cobre) sobre a atividade de bactérias anammox e avaliar a toxicidade conjunta de dois ou mais compostos sobre a atividade anammox.
- Promover a alimentação do reator com efluente industrial real, a fim de avaliar o comportamento das bactérias anammox em relação à remoção de nitrogênio quando submetidas a um efluente contendo constituição mais complexa do que o meio mineral autotrófico que foi utilizado no presente trabalho.
- Investigar a aplicação de processos de geração de nitrito em conjunto com o processo anammox para o tratamento de efluentes.
- Enriquecer e cultivar bactérias anammox em reatores de maior escala, para obtenção de biomassa anammox disponível e em quantidade suficiente para posteriormente servir como inóculo para a partida de novos reatores, facilitando desta maneira, as pesquisas realizadas futuramente e possibilitando, eventualmente, a utilização da tecnologia em escala plena no Brasil.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABMA, W. R.; SCHULTZ, C.; MULDER, J.; VAN LOOSDRECHT, M.; VAN DER STAR, W.; STROUS, M.; TOKUTOMI, T. The advanced anammox. *Water*, v. 21, p. 36-37, 2007.

AFZAL, M; IQBAL, S.; RAUF, S.; KHALID, Z. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. *Journal Hazardous Materials*, v. 149, p. 60-66, 2007.

AGARRI, S. E.; DUROJAIYE, A. O.; YUSUF, R. O.; AREMU, M. O. Biodegradation of phenol in refinery wastewater by pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950 and *Pseudomonas fluorescence* NCIB 3756. *International Journal Environmental Pollution*, v. 32, p. 3-11, 2008.

ALLSOP, P. J.; CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M.; SULLIVAN, G. R. Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, p. 572-580, 1993.

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, v. 59, p.143- 169, 1995.

APHA - American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21 ed, Washington, DC, 2005.

APHA - American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22 ed, Washington, DC, 2012.

AHN, Y. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1709-1721, 2006.

ARAÚJO, J. C.; CAMPOS, A. C.; CORREA, M. M.; SILVA, E. C.; MATTÉ, M. H.; MATTÉ, G. R.; VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C. A. L. Anammox bactéria enrichment and characterization from municipal activated sludge. *Water Science and Technology*, v. 64, p. 1428-1434, 2011.

BANDYOPADHYAY, K.; DAS, D.; MAITI, B. R.. Kinetics of phenol degradation using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Bioprocess Engineering*, v. 18, p. 373-377, 1998.

BARKER, D. J.; STUCKEY, D. C. A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. *Water Research*, v. 33, p. 3063-3082, 1999.

BOTHE, H., FERGUSON, S. J., NEWTON, W.. E. *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier. 2007, 427 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br>> Acesso em 31 de maio de 2012.

- BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, v. 17, p. 491-493, 1977.
- BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, C. N. E.. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Willian & Wilkins, Baltimor. 8th edition, 1974, 1268 p.
- CAMPOS, A. P. *Enriquecimento e caracterização de bactérias anammox para a remoção de nitrogênio amoniaco de efluentes*. Belo Horizonte, 2010, 122 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- CAPORASO, G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.; COSTELLO, E.; FIERER, N.; PENA, A.; GOODRICH, J.; GORDON, J.; HUTTLEY, G.; KELLEY, S.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.; LEY, R.; LOZUPONE, C.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.; TURNBAUGH, P.; WALTERS, W.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- CARVAJAL-ARROYO, J. M.; SUN, W.; SIERRA-ALVAREZ, R.; FIELD., J. A. Inhibition of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) enrichment cultures by substrates, metabolites and common wastewater constituents. *Chemosphere*, v. 91, p. 22-27, 2013.
- CASTAÑEDA-CHAVEZ, M. R.; GALAVIZ-VILLA, I.; LANDEROS-SANCHEZ, C.; LANGO-REYNOSO, F.; MARTINEZ-DÁVILA, J.; NIKOLSKII-GAVILOV, I. Agricultural contamination of subterranean water with nitrates and nitrites: an environmental and public health problem. *Journal of Agricultural Science*, p. 17-21, 2010.
- CHANCHOI, N.; NITISORAVUT, S.; SCHIMIDT, J. E. Inactivation of anammox communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3331-3336, 2008.
- CHAMCHOI, N.; NITISORAVUT, S. Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere*, v. 66, p. 2225-2232, 2007.
- CHO, S.; TAKAHASHI, Y.; FUJII, N.; YAMADA, Y.; SATOH, H.; OKABE, S. Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. *Chemosphere*, v. 78, p. 1129-1135, 2010.
- COLLINS, G.; FOY, C.; McHUGH, S.; MAHONY, T.; O'FLAHERTY, V. Anaerobic biological treatment of phenolic wastewater at 15-18 °C. *Water Research*, v. 39, p. 1614-1620, 2005.
- DAPENA-MORA, A.; FERNANDÉZ, I.; CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R.; JETTEN, M. S. M. Evaluation of activity and inhibition effects on anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 859-865, 2007.
- DAPENA-MORA, A.; VAN HULLE, S. W. H.; CAMPOS, J. L.; MENDEZ, R.; VAN ROLLEGHEM, P. A.; JETTEN, M. S. M. Enrichment of anammox biomass from municipal

activated sludge: experimental and modeling results. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 79, p. 1421-1428, 2004.

DATE, Y.; ISAKA, K.; IKUTA, H.; SUMINO, T.; KANEKO, N.; YOSHIE, S.; TSUNEDA S.; INAMORI, Y. Microbial diversity of anammox bacteria enriched from different types of seed sludge in an anaerobic continuous-feeding cultivation reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, p. 281–286, 2009.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, August 12, 2010, 2010.

EGLI, K.; BOSSHARD, F.; WERLEN, C.; LAIS, P.; SIEGRIST, H.; ZEHNDER, A. J. B.; VAN DER MEER, J. R. Microbial Composition and Structure of a Rotating Biological Contactor Biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microbial Ecology*, v. 45, p. 419-432, 2003.

EGLI, K.; FANGERS, U.; ALVAREZ, P. J. J.; SIEGRIST, H.; VAN DER MEER, J. R.; ZEHNDER, A. J. B. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology*, v. 175, p. 198-207, 2001.

EL-NAAS, M. H.; AL-MUHTASEB, S. A.; MAKHLOUF, S.. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, p. 720-725, 2009.

FERNANDÉZ, I.; DOSTA, J.; FAJARDO, C.; CAMPOS, J. L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; MÉNDEZ, R. Short- and long-terms effects of ammonium and nitrite on the anammox process. *Journal and Environmental Management*, v. 95, p. 170-174, 2012.

FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARD, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16 rRNA – Defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 340-346, 1996.

FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews*, v. 9, p. 403-413, 2011.

GAO, D.; TAO, Y. Versatility and application of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, p. 887-894, 2011.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 733-739, 2005.

GOMES, A. S. *Análise de dados ecológicos*. Niterói: Universidade Federal Fluminense. 2004, 30 p.

GÜVEN, D.; DAPENA, A.; KARTAL, B.; SCHIMID, M. C.; MAAS, B.; VAN DE PAS-SCHOONEM, K.; SOZEN, S.; MENDEZ, R.; OP DEN CAMP, H. J. M.; JETTEN, M.; STROUS, M.; SCHIMIDT, I. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic

- ammonium oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 1066-1071, 2005.
- HARHANGI, H. R.; ROY, M. L.; VAN ALEN, T.; HU, B.; GROEN, J.; KARTAL, B.; TRINGE, S. G.; QUAN, Z.; JETTEN, M. S. M.; CAMP, H. J. M. O. Hydrazine synthase, a unique phylomarker with which to study the presence and biodiversity of anammox bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, p. 752-758, 2012.
- HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 54, p. 33-45, 2008.
- HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; WITTEBOLLE, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N.; DE VOS, P. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 2637-2643, 2006.
- HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W.; WEBB, R. I.; WAGNER, A. M.; BLACKALL, L. Investigation of Candidate Division TM7, a recently recognized major lineage of the domain *Bacteria* with no Known pure-culture representatives. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 411-419, 2001.
- ISAKA, K.; KIMURA, Y.; OSAKA, T.; TSUNEDA, S. High-rate denitrification using polyethylene glycol gel carriers entrapping heterotrophic denitrifying bacteria. *Water Research*, v. 46, p. 4941-4948, 2012.
- ISAKA, K.; SUMINO, T.; TSUNEDA, S. High nitrogen removal performance at moderately low temperature utilizing anaerobic ammonium oxidation reactions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 103, p. 486-490, 2007.
- JETTEN, M. S. M.; VAN NIFTRIK, L.; STROUS, M.; KARTAL, B.; KELTJENS, J. T.; CAMP, H. J. M. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 44, p. 65-84, 2009.
- JETTEN, M. S. M.; WAGNER, M.; FUERST, J. A.; VAN LOOSDRECHT, M.; KUENEN, J. G.; STROUS, M. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ("anammox") process. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, p. 283-288, 2001.
- JETTEN, M. S. M.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; SCHALK, J.; VAN DONGEN, U.; VAN DE GRAAF, A. A.; LOGEMAN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; KUENEN, J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, p. 421-435, 1998.
- JIN, R.; YANG, G.; YU, J.; ZHENG, P. The inhibition of anammox process: a review. *Chemical Engineering Journal*, v. 197, p. 67-79, 2012.
- KADAM, P. C.; BOONE, D. R. Influence of pH on ammonia accumulation and toxicity in halophilic, methylotrophic methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 4486-4492, 1996.

- KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; KELTJENS, J. T.; CAMP, H. J. M.; JETTEN, M. S. M. Anammox – Growth physiology, cell biology and metabolism. *Advances in Microbial Physiology*, v. 60, p. 211-262, 2012.
- KARTAL, B.; MAALCKE, W. J.; ALMEIDA, N. M.; CIRPUS, I.; GLOERIC, J.; GEERTS, W.; CAMP, J. M.; HARHANGI, H. R.; JANSSEN-MEGENS, E. M.; FRANCOIJS, K.; STUNNENBERG, H. G.; KELTJENS, J. T.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. Molecular Mechanisms of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, v. 479, p. 127-130, 2011.
- KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; RATTRAY, J.; VAN DE VOSSENBERG, J. L. C. M.; SCHIMID, M. C.; DAMSTÉ, J. S.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. *Candidatus* ‘Brocadia fulgida’: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 63, p. 46-55, 2008.
- KARTAL, B.; RATTRAY, J.; VAN NIFTRIK, L. A.; VAN DE VOSSEMBERG, J.; SCHIMID, M. C.; WEBB, R. I.; SCHOUTEN, S.; FUERST, J. A.; DAMSTÉ, J. S.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. *Candidatus* “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 30, p. 39-49, 2007.
- KIELING, D. D. *Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas*. Florianópolis, 2004, 106 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- KIMURA, Y.; ISAKA, K.; KAZAMA, F.; SUMINO, T. Effects of nitrite inhibition on anaerobic ammonium oxidation. *Environmental Biotechnology*, v. 86, p. 359-365, 2010.
- KRAGELUND, C.; THOMSEN, T. R.; MIELCZAREK, A. T.; NIELSEN, P. H. Eikelboom’s morphotype 0803 in activated sludge belongs to the genus *Caldilinea* in the phylum Chloroflexi. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 76, p. 451-462, 2011.
- KUAI, L.; VERSTRAETE, W. Ammonium removal by Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification system. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 4500-4506, 1998.
- LACKNER, S.; TERADA, A.; SMETS, B. F. Heterotrophic activity compromises autotrophic nitrogen removal in membrane-aerated biofilms: results of a modeling study. *Water Research*, v. 42, p. 1101-1112, 2008.
- LAKSHMI, K. V. N. S.; SASIKALA, C.; RAMANA, C. V. *Rhodoplanes pokkaliisoli* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a waterlogged brackish paddy soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 2153-2157.
- LALUCAT, J.; BENNASAR, A.; BOSCH, R.; GARCÍA-VALDÉS, E.; PALLERONI, N. J. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 70, p. 510-547, 2006.

LEMMER, H.; ZAGLAUER, A.; NEEF, A.; MEIER, H.; AMANN, R. Denitrification in methanol-fed fixed bed reactor. Part 2: Composition and ecology of the bacterial community in the biofilms. *Water Research*, v. 31, p. 1903-1908, 1997.

LETAIN, T. E.; KANE, S. R.; LEGLER, T. C.; SALAZAR, E. P.; AGRON, P. G.; BELLER, H. R.. Development of a genetic system for the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 3265-3271, 2007.

LI-DONG, S.; AN-HUI, H.; REN-CUN, J.; DONG-QING, C.; PING, Z.; XIANG-YANG, X.; BAO-LAN, H. Enrichment of anammox bacteria from three sludge sources for the start up of monosodium glutamate industrial wastewater treatment system. *Journal of Hazardous Materials*, v. 199, p. 193-199, 2012.

LÓPEZ, H.; PUIG, S.; GANIGUÉ, R.; RUSCADELLA, M.; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J. Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters. *Journal of Chemical Technology and biotechnology*, v. 83, p. 233-241, 2008.

LUZ, G. L.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; AMARAL, A. D.; MÜLLER, L.; TORRES, M. G.; MENTGES, L. A questão do nitrato em alface hidropônica e a saúde humana. *Ciência Rural*, v. 38, p. 2388-2394, 2008.

MAC CONELL, E. F. A. Investigação microbiológica da remoção de nitrogênio em filtros biológicos percoladores pós reator UASB. Belo Horizonte, 2012, 88 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128p.

MAGRÍ, A.; VANOTTI, M. B.; SZÖGI, A. A. Anammox sludge immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) cryogel carriers. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 231-241, 2012.

MARAÑÓN, E.; VÁZQUEZ, I.; RODRÍGUEZ, J.; CASTRILLÓN, L.; FERNÁNDEZ, Y. Coke wastewater treatment by a three-step activated sludge system. *Water soli air pollution*, v. 192, p. 155-164, 2008.

MARTINELLE, K.; WESTLUND, A.; HÄGGSTRÖM, L. Ammonium ion transport- a cause of death cell. *Cytotechnology*, v. 22, p. 251-254, 1996.

MARTINS, T. H. Conversão de compostos nitrogenados em reatores biológicos: operação, caracterização microbiológica e filogenética. São Carlos, 2010, 115 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

MARTINS, M.; FALEIRO, M. L.; CHAVES, S.; TENREIRO, R.; SANTOS, E.; COSTA, M. C. Anaerobic bio-removal of uranium (VI) and chromium (VI): Comparison of microbial community structure. *Journal of Hazardous Materials*, v. 176, p. 1065-1072, 2010.

MEGAERT, J.; CNOCKAERT, M. C.; SWINGS, J. *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poli(ϵ -caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus

- Thermomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1961-1966, 2003.
- MOLINUEVO, B.; GARCÍA, M. C.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Anammox from ammonia removal from pig manure effluents: effect of matter organic content on process performance. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2171-2175, 2009.
- 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*, v. 16, p. 177-184, 1995.
- MUYZER, G.; WAAL, E.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 695-700, 1993.
- NI, B.; HU, B.; FANG, F.; XIE, W.; KARTAL, B.; LIU, X.; SHENG, G.; JETTEN, M.; ZHENG, P.; YU, H. Microbial and Physicochemical characteristics of compact anaerobic ammonium-oxidizing granules in a upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 2652-2656, 2010.
- OKAMURA, K.; KANBE, T.; HIRAISHI, A. *Rhodoplanes serenus* sp. nov., a purple non sulfur bacterium isolated from pond water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 531-535, 2009.
- OMENA, S. P. F. Remoção de fenol em reator anaeróbio de leito fluidificado sob condições desnitrificantes. São Carlos, 2008, 129 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- OSHIKI, M.; SHIMOKAWA, M.; FUJII, N.; SATOH, H.; OKABE, S. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacteria 'Candidatus Brocadia sinica'. *Microbiology*, v. 157, p. 1706-1713, 2011.
- PARK, H.; ROSENTHAL, A.; RAMALINGAM, K.; FILLOS, J.; CHANDRAN, K. Linking community profiles, gene expression and N-removal in anammox bioreactors treating municipal anaerobic digestion reject water. *Environmental Science and Technology*, v. 44, p. 6110-6116, 2010.
- QUAN, Z.; RHEE, S.; ZUO, J.; YANG, Y.; BAE, J.; PARK, J. R.; LEE, S.; PARK, Y. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 3130-3139, 2008.
- QUEIROZ, L. M. *Tratamento de despejo de coqueria via nitrificação/desnitrificação operando um sistema de lodo ativado em bateladas sequenciais*. São Paulo, 2009, 185 p. Tese (Doutorado). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- QUINTAES, B. R.; SILVA, C. A. M. C.; HINOJOSA, M. A. G.; CAMPOS, J. A. Avaliação de comunidades microbianas em lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos – revisão. *Revista de Ciência e Tecnologia*, v. 12, p. 7-19, 2012.

RAGHOEBARSING, A.; POL, A.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; SMOLDERS, A. J. P.; ETTWIG, K. F.; RIJPSRA, W. I. C.; SCHOUTEN, S.; DAMSTÉ, J. S. S.; CAMP, H. J. M.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*, v. 440, p. 918-921, 2006.

REARDON, K. F.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. D. B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 69, p. 385-400, 2000.

REICHENBACH, H. *Nannocystis exedens* gen. nov., spec. nov., a new myxobacterium of the family *Sporangiaceae*. *Archiv für Mikrobiologie*, v. 70, p. 119-138, 1970.

SÁNCHEZ, C.; TORTOSA, G.; GRANADOS, A.; DELGADO, A.; BEDMAR, E. J.; DELGADO, M. J. Involvement of Bradyrhizobium japonicum denitrification in symbiotic nitrogen fixation by soybean plants subject to flooding. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 43, p. 212-217, 2011.

SCHEEREN, M. B.; KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; DRESSLER, V. L. O processo anammox como alternativa para o tratamento de águas residuárias contendo alta concentração de nitrogênio. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 15, p. 1289-1297, 2011.

SCHIMID, M.; WALSH, K.; WEBB, R.; RIJPISTRA, W. I. C.; VAN DE PAS-SCHOONEN, VERBRUGGEN, M. J.; HILL, T.; MOFFET, B.; FUERST, J.; SCHOUTEN, S.; DAMSTÉ, J. S. S.; HARRIS, J.; SHAW, P.; JETTEN, M.; STROUS, M. *Candidatus* “*Scalindua brodae*”, sp nov., *Candidatus* “*Scalindua wagneri*”, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, p. 529-538, 2003.

SCHMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M.; STROUSS, 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*, v. 23, p. 93-106, 2000.

SEKIGUSHI, Y.; YAMADA, T.; HANADA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. *Anaerolinea Thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain *Bacteria* at the subphylum level. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1843-1851, 2003.

SEVIOUR, R. J.; BLACKALL, L. L. Current taxonomic status of filamentous bacteria found in activated sludge plants. In the microbiology of activated sludge sludge. Seviour, R. J.; Blackall, L.L. (ed). *Kluwer Academic Publishers*, p. 122-146, 1999.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. *The mathematical theory of communication*. Urbana. University of Illinois Press. 1949, 117 p.

STROUS, M.; PELLETIER, E.; MANGENOT, S.; RATTEI, T.; LEHNER, A.; TAYLOR, M. W.; HORN, M.; DAIMS, H.; SCHENOWITZ-TRUONG, C.; BARTOL-MAVEL, D.; WINCKER, P.; BARBE, V.; FONKNECHTEN, N.; VALLENET, D.; SEGURENS, B.; SCHENOWITZ-TRUONG, C.; MÉDIGUE, C.; COLLINGRO, A.; SNEL, B.; DUTILH, B.

E.; CAMP, H. J. M.; VAN DER DRIFT, C.; CIRPUS, I.; VAN DE PAS-SHOONEN, K. T.; HARHANGI, H. R.; VAN NIFTRIK, L.; SCHIMID, M.; KELTJENS, J.; VAN DE VOSSENBERG, J.; KARTAL, B.; MEIER, H.; FRISHMAN, D.; HUYNEN, M. A.; MEWES, H.; WEISSENBAACH, J.; JETTEN, M. S. M.; WAGNER, M.; LE PASLIER, D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, v. 440, p. 790-794, 2006.

STROUS, M.; FUERST, J. A.; KRAMER, E. H. M.; LOGEMANN, S.; MUYSER G.; VAN DE PAS-SCHOONEN K. T.; WEBB R.; KUENEN J. G.; JETTEN M. S. M. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, v. 400, p. 446-449, 1999a.

STROUS, M.; KUENEN J. G.; JETTEN M. S. M. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied Environmental and Microbiology*, v. 65, p. 3248-3250, 1999b.

STROUS, M.; HEIJNEN, J. J.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 50, p. 589-596, 1998.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. And Evol.*, 24:1596-1599, 2007.

TANG, C.; ZHENG, P.; CHEN, T.; ZHANG, J.; MAHMOOD, Q.; DING, S.; CHEN, X.; CHEN, J.; WU, D. Enhanced nitrogen removal from pharmaceutical wastewater using SBA-ANAMMOX process. *Water Research*, v. 45, p. 201-210, 2011a.

TANG, C.; ZHENG, P.; WANG, C.; MAHMOOD, Q.; ZHANG, J.; CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEN, J. Performance of high-loaded Anammox UASB reactors containing granular sludges. *Water Research*, v. 45, p. 135-144, 2011b.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, M. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, v.44, n.1, p.1-22, 2009.

THIRD, K. A.; SLIEKERS, A. O.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-Removal Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 2001, p. 588-596, 2001.

TIEDJE, J. M. Ecology of Denitrification and Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium. In: ZEHNDER, A. J. B. *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York. 1988, p. 179-245.

TOH, S. K.; ASHBOLT, N. J. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 344-352, 2002.

TOH, S. K.; WEBB, R. I.; ASHBOLT, N. J. Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium oxidizing consortia from various wastewaters. *Microbial Ecology*, v. 43, p. 154-167, 2002.

TSCHECH, A.; FUCHS, G. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying *Pseudomonas*. *Archives in Microbiology*, v. 148, p. 213-217, 1987.

- ULLHYAN, A.; GHOSH, U. K. Biodegradation of phenol with immobilized *Pseudomonas putida* activated carbon packed bio-filter power. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, p. 15160-15167, 2012.
- VAL-MORAES, S. P. *Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA*. Jaboticabal, 2008, 170p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do *Campus* de Jaboticabal, Jaboticabal, 2008.
- VAN DE GRAAF, A. A., BRUIJN, P., ROBERTSON, L. A., JETTEN, M. S. S., KUENEN, J. G. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v. 143, p. 2415-2421, 1997.
- VAN DE GRAAF A. A.; BRUIJN P.; ROBERTSON, L. A.; JETTEN, M. S. M.; KUENEN, J. G. Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidation micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v. 142, p. 2187-2196, 1996.
- VAN DE GRAAF, A. A.; MULDER, A.; BRUIJN, P.; JETTEN, M. S. M.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied Environmental and Microbiology*, v. 61, p. 1246-1251, 1995.
- VAN DER STAR, W. R. L.; MICLEA, A. I.; VAN DONGEN, U. G. J. M.; MUYZER, G.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The membrane bioreactor: a novel tool grow anammox bacteria as free cell. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, p. 286-294, 2008.
- VAN DER STAR, W. R. L.; ABMA, W. R.; BLOMMERS, D.; MULDER J-W.; TOKUTOMI, T.; STROUS, M.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research*, v. 41, p. 4149-4163, 2007.
- VAN DONGEN, U.; JETTEN, M. S. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The SHARON[®]-ANAMMOX[®] process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology*, v. 44, p. 153-160, 2001.
- VAN NIFTRIK, L.; FUERST, J. A.; DAMSTÉ, J. S. S.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 233, p. 7-13, 2004.
- VAN SCHIE, P. M.; YOUNG, L. Y. Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation journal*, v. 4, p. 1-18, 2000.
- VANOTTI, M. B.; SZOGI, A. A.; ROTHROCK, M. J. Novel anammox bacterium isolate. Pub. No. US2011/0180476. July 28, 2011.
- VAZQUEZ-PADÍN, J.; MOSQUERA-CORRALM A.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R.; REVSBECH, N. P. Microbial community distribution and activity dynamics of granular biomass in a CANON reactor. *Water Research*, v. 44, p. 4359-4370, 2010.
- VAZQUEZ-PADÍN, J.; FERNANDÉZ, I.; FIGUEROA, M.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R. Applications of Anammox based process to treat anaerobic

- digester supernatant at room temperature. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2988-2994, 2009a.
- VAZQUEZ-PADÍN, J.; POZO, M. J.; JARPA, M.; FIGUEROA, M.; FRANCO, A.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J. L.; MÉNDEZ, R. Treatment of anaerobic sludge digester effluents by the CANON process in an air pulsing SBR. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, p. 336-341, 2009b.
- VIANCELLI, A.; KUNZ, A.; ESTEVES, P. A.; BAUERMANN, F. V.; FURUKAWA, K.; FUJII, T.; ANTÔNIO, R. V.; VANOTTI, M. Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with anammox activity inoculated with swine sludge. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, p. 1035-1041, 2011.
- VON SPERLING, M. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: introdução à qualidade das águas e ao tratamento dos esgotos*. 3 ed. Belo Horizonte: UFMG, 2005, 452 p.
- WANG, T.; ZHANG, H.; GAO, D.; YANG, F.; YANG, S.; JIANG, S.; ZHANG, G. Enrichment of anammox bacteria in seed sludges from different wastewater treating process and start-up of anammox process. *Desalination*, v. 271, p. 193-198, 2011.
- WARD, N. L.; CHALLACOMBE, J. F.; JANSSEN, P. H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D. H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R. D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T. S.; BRINKAC, L. M.; BRUCE, D.; CREASE, T.; DAUGHERTY, S. C.; DAVIDSEN, T. M.; DEBOY, R. T.; DETTER, J. C.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, S. C.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S. P.; MADUPU, R.; NELSON, K. E.; NELSON, W. C.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S. A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L. S.; WATKINS, K. L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C. R. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 2046-2056, 2009.
- WHELAN, J. A.; RUSSEL, N. B.; WHELAN, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, v. 278, p. 261-269, 2003.
- WOEBKEN, D.; LAM, P.; KUYPERS, M. M. M.; NAQVI, W. A.; KARTAL, B.; STROUS, M.; JETTEN, M. S. M.; FUCHS, B. M.; AMANN, R. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel Candidatus Scalindua phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 3106-3119, 2008.
- WORM, P.; STAMS, A. J. M.; CHENG, X.; PLUGGE, C.. Growth- and substrate-dependent transcription of formate dehydrogenase and hydrogenase coding genes in *Syntrophobacter fumaroxidans* and *Methanospirillum hungatei*. *Microbiology*, v. 157, p. 280-289, 2011.
- YAMADA, T.; IMACHI, H.; OHASHI, A.; HARADA, H.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; SEKIGUSHI, Y.. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum *Chloroflexi* isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 2299-2306, 2007.

YANG, G.; JIN, R. The joint inhibitory effects of phenol, copper (II), oxytetracycline (OTC) and sulfide on anammox activity. *Bioresource Technology*, v. 126, p. 187-192, 2012.

YE, R. W.; THOMAS, S. M. Microbial Nitrogen Cycles: physiology, genomics and application. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, 307-3012, 2001.

ZHANG, M.; TAY, J.H.; QIAN, Y.; GU, X.S. Coke plant wastewater treatment by fixed biofilm system for COD and NH₃-N removal. *Water Research*, v. 32, p. 519-527, 1998.

ZHU, G.; PENG, Y.; LI, B.; GUO, J.; YANG, Q.; WANG, S. Biological removal of nitrogen from wastewater. *Reviews Environmental Contamination & Toxicology*, v. 192, p. 159-195, 2008.

ZHU, G.; JETTEN, M. S. M.; KUSCHK, P.; ETTWIG, K. F.; CHENGQING, Y. Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetlands ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 86, p. 1043-1055, 2010.

ZILLES, J. L.; PECCIA, J.; KIM, M.; HUNG, C.; NOGUERA, D. R. Involvement of Rhodocyclus-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 2763-2769, 2002.