

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,  
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**“IMPACTO DO TIPO DE INÓCULO E DAS  
CONDIÇÕES OPERACIONAIS SOBRE A ESTRUTURA  
DA COMUNIDADE BACTERIANA E DESEMPENHO  
DO PROCESSO ANAMMOX EM BIOFILTROS  
USANDO ESPUMA DE POLIURETANO COMO MEIO  
SUPORTE DOS MICRORGANISMOS.”**

**Maria Cristina Monteiro de Souza Costa**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Calábria de Araújo**

**Belo Horizonte**

**2013**

**Maria Cristina Monteiro de Souza Costa**

**“Impacto do tipo de inóculo e das condições operacionais sobre a estrutura da comunidade bacteriana e desempenho do processo ANAMMOX em biofiltros usando espuma de poliuretano como meio suporte dos microrganismos.”**

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

**Área de concentração:** Meio Ambiente

**Linha de Pesquisa:** Tratamento de Águas Residuárias

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Juliana Calábria de Araújo

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia da UFMG

2013

C837i

Costa, Maria Cristina Monteiro de Souza.

Impacto do tipo de inóculo e das condições operacionais sobre a estrutura da comunidade bacteriana e desempenho do processo ANAMMOX em biofiltros usando espuma de poliuretano como meio suporte dos microrganismos [manuscrito] / Maria Cristina Monteiro de Souza Costa. - 2013.

xii, 107 f., enc.: il.

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f.99-107.

1. Engenharia sanitária - Teses. 2. Meio ambiente - Teses. 3. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico - Teses. 4. Biorreatores - Teses. I. Araújo, Juliana Calábria de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 628(043)

*“Nada é tão negativo que não possamos transformar com nossa luminosidade”  
Padma Santem.*

À Deus

À minha família, o bem mais precioso da minha vida, sempre me ensinando o significado do amor, apoio, doação, perdão, alegria, confiança e realização,

Ezequiel e Maria José,

Ezequiel Jr., Eugênio, Clara, Fernando, Ângela, Celeste e Hermes,

Gustavo e Giovana,

Vitor e Raphael,

Gilson, Glaucia, Manoel,

Afrodite, Nina e Doçura

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas estiveram envolvidas nas diferentes etapas de elaboração e execução deste trabalho, das quais gostaria de agradecer em especial,

à professora e orientadora Juliana Calábria de Araújo pela orientação dedicada, segura, e sobretudo, pela paciência durante a construção desse trabalho, que certamente gerou em mim, amadurecimento, crescimento técnico e pessoal que repercutirão positivamente naqueles que cruzarem meu caminho. Muito obrigada!

à Celeste e ao Hermes pela ajuda constante, em tudo, me ajudando a resolver qualquer tipo de problema!!!! Vocês assinam comigo todas as realizações que obtive!! Merecem todas as publicações!! Amo vocês, TUDO!

ao professor Carlos Chernicharo, por viabilizar a disponibilização de amostras cedidas pela REGAP- Petrobrás e pelas valiosas orientações sobre a aquisição do material suporte e confecção dos reatores utilizados, além da agradável convivência ao longo desse período.

ao professor Marcos von Sperling pelo exemplo de competência e humildade, colaboração e estímulo.

ao Sérgio Costa, Andrea Amaral e Daniela Bartholomeu, professores do Instituto de Ciências Biológicas -UFMG, e à Sophie Leclercq, pesquisadora da Fundação Ezequiel Dias, por disponibilizarem os laboratórios para a realização das várias análises moleculares e filogenéticas. Obrigada pelo acolhimento de sempre!

à professora Miriam Amaral pelo incentivo e esclarecimento sobre o tema "Tratamento de Efluentes" que desencadearam a realização dessa pesquisa.

aos professores, funcionários e alunos envolvidos no Programa de Pós Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos por toda contribuição dedicada a

realização desse trabalho, em particular Iara, Cláudia, Danusa, Lucilaine, Cristiane, Cassiano Susane e Alexandre.

à Helene, por partilhar com muita doçura seu espaço de trabalho para a instalação dos reatores.

ao Sr. Raimundo por me acompanhar e ajudar em todas as coletas de lodos realizadas no CePTS- ETE Arrudas.

a todos os professores e funcionários do Departamento de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Em particular à Miriam Stassun, Heloisa Ferreira, Janice Cardoso, Marcio Basílio e Luzia de França pela amizade, apoio, disponibilidade e incentivo.

aos meus alunos, por fazerem sempre parte de grande motivação para meu aprimoramento pessoal e profissional.

a empresa Petrobrás SA, pela doação das amostras da ETE -REGAP, em particular ao José Vitoretti, Cristian Ferreira, Claudia Zanette, Vitor Menicone e Simone Araújo.

ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro essencial para a execução do trabalho.

aos companheiros e amigos de laboratório, Adriana Zerbini, Valéria Martins, Érika Mac Conell, Ana Paula Campos, Luciana Carvalho, Douglas Bouniek, Renata Côrtes, Cintia Leal, Graziela Garcia, Luciene Alves, Victor Franco Grazi, Alyne Duarte, Marcela Dias, Karoline Lopes, Guilherme Brugger, Isabella Mancuelo, pela ajuda, incondicional dispensada a mim, além da deliciosa convivência e torcida para conseguirmos “reatores com cor alaranjada”, sucesso do DGGE, etc. Vocês compõem a equipe que realizou esse trabalho, serei sempre grata!

à professora Claudia Etchebere Arenas, do Laboratório de Ecologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguai e ao Dagoberto Okada, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São

## AGRADECIMENTOS

---

Paulo –USP, pela contribuição com as análises realizadas por pirosequenciamento das amostras.

à Mariana, Patrícia Costa, Alexandre, alunos do Laboratório de Genética de Microrganismos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela colaboração das análises filogenéticas .

aos amigos Fausto Brito e Ildeu Lazarinne que fazem com que a minha vida seja regada com mais amor, cumplicidade, confiança e leveza, obrigada!

às minhas amigas Juliana Pimenta, Soraya Correa, Sophie Leclercq, Liliane e Janaina, pelo companheirismo, apoio, conselhos, dedicação e amizade.

aos amigos, Salim Zaidam, Elizabeth Zaidam e Fábria Freitas por me oferecerem preciosas ferramentas de sabedoria, que permitem o seguir da vida, com tudo e apesar de tudo, sempre, com muita gratidão.

à família Rezende Menicone: Renato, Cristina, Renata e Laura, pela doce e ativa presença em todas as etapas da minha vida!!

ao casal Edna Rezende e Edmar Rezende (*in memoriam*), e amiga Silvana Rezende pelo estímulo e grande apoio ao meu ingresso na Universidade.

a todos os seres, dos diferentes Reinos, que contribuíram de forma essencial para a concretização dessa pesquisa.



## RESUMO

A oxidação anaeróbia da amônia (Anammox), realizada por bactérias anaeróbias, quimiolitotróficas, é a via mais recentemente descoberta sobre o ciclo biológico do nitrogênio. Esse processo tem sido amplamente estudado como alternativa na remoção de nitrogênio amoniacal de águas residuárias devido a sua eficiência, menores custos operacionais e sustentabilidade ambiental. O presente estudo avalia o impacto do tipo de inóculo e condições operacionais sobre o desempenho do processo Anammox, bem como a estrutura microbiana desenvolvida em reatores anaeróbios. Foram utilizados dois reatores, RI e RII, de leito fixo, com fluxo ascendente e contínuo (2L). Dois tipos de inóculos foram aplicados: um lodo oriundo de sistemas de tratamento de efluente sanitário- *wetland* construída (CePTS); e o segundo oriundo do sistema de tratamento de efluente industrial (REGAP/ Petrobras). Esses lodos foram previamente selecionados por apresentarem resultados de PCR positivos para a detecção de bactérias Anammox. A diversidade de bactérias Anammox dos inóculos foi avaliada pela técnica de clonagem. A amostra da *Wetland* construída (inoculada em RI) foi dominada por único gênero Anammox, “*Candidatus*” *Brocadia*, enquanto o lodo REGAP (inoculado em RII) apresentou três gêneros de Anammox: *Ca. Anammoxoglobus*, *Ca. Kuenenia* e *Ca. Brocadia*, com predominância de *Ca. Anammoxoglobus* e *Ca. Brocadia*. Resultados do monitoramento dos reatores mostrou que foi possível desenvolver atividade e biomassa Anammox a partir dos inóculos selecionados após um ano de cultivo. A eficiência média de remoção de N-  $\text{NH}_4^+$  e N-  $\text{NO}_2^-$  obtida, após um ano de operação, foi de 97% para uma concentração 110 and 145mg L<sup>-1</sup> respectivamente. A análise da diversidade microbiana das amostras coletadas nos reatores RI e RII, após 440 dias de operação, realizada pela técnica de pirosequenciamento demonstrou que a comunidade enriquecida nos reatores apresentou composição diversa. Porém os grupos predominantes foram semelhantes. Os filos dominantes detectados em ambos os reatores foram *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* e *Acidobacteria*. No entanto, os filos *Acidobacteria* e *GN04* foram observados pela primeira vez em reatores Anammox, sugerindo a sua importância para este processo. Em relação à comunidade Anammox desenvolvida nos reatores, concluímos que as condições operacionais semelhantes, utilizadas no enriquecimento selecionaram a mesma população de

Anammox, pertencente ao gênero *Ca. Brocadia* em ambos os reatores, apesar das diferenças observadas no inóculo. Portanto, os lodos selecionados foram capazes de desenvolver atividade e biomassa Anammox nos reatores anaeróbios, após cultivo e operação sob condições anóxicas e autotróficas. Verificou-se, também, que os inóculos têm impacto sobre a composição da biomassa microbiana desenvolvida nos reatores, mas as condições operacionais aplicadas desempenharam papel importante na seleção da comunidade de bactérias Anammox.

**ABSTRACT**

The anaerobic ammonium oxidation (Anammox) is catalyzed by anaerobic, chemolithoautotrophic bacteria and is the last discovered microbial pathway in the biological nitrogen cycle, and a new cost-effective method for removal of ammonium from wastewater. This process has been widely studied as alternative in the removal of ammonium nitrogen from wastewater due to its efficiency, lower operating costs and environmental sustainability. This study evaluates the impact of type inoculum and operating conditions on the performance of the Anammox process and microbial structure developed in reactors. Two reactors (RI and RII) of 2L, up flow fixed bed biofilm continuous were used. Two types of inoculum were applied: one sludge coming from wastewater treatment wetland health-built (CePTS) systems, and the second coming from the treatment of industrial effluent (REGAP / Petrobras) system. These sludges were previously selected for positive PCR results presented for the detection of Anammox bacteria. The diversity of Anammox bacteria inoculum was assessed by cloning technique. The sample of the constructed wetland (inoculated in RI) was dominated by Anammox single genus, "*Candidatus*" *Brocadia* while REGAP sludge (inoculated in RII) presented three genera of Anammox: *Ca. Anammoxoglobus*, *Ca. Kuenenia* and *Ca. Brocadia* and with predominance of *Ca. Anammoxoglobus* and *Ca. Brocadia*. It was possible to develop Anammox activity and biomass from selected. Results reactors monitoring showed that it was possible to develop Anammox activity and biomass from selected after a year of cultured. The average ammonium and nitrite removal efficiencies of 97% were obtained after one year of operation, based on the influent  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  concentrations of 110 and 145  $\text{mg L}^{-1}$  for both reactors respectively. The analysis of the microbial diversity of samples collected in the reactors RI and RII, after 440 days of operation, obtained by pyrosequencing technique, demonstrated that the enriched community in the reactors showed different composition, despite similar operating conditions. But the predominant groups were similar. The dominant phyla detected in both reactors were *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* and *Acidobacteria*. However, the phyla *Acidobacteria* and *GN04* were first observed in Anammox reactors, suggesting its importance in this process. Regarding the Anammox community developed after 440 days of operation of the

reactors, was concluded that similar operating conditions used in enrichment, selected the same Anammox population, belonging to the genus *Ca. Brocadia* in both reactors, despite the differences observed in the initial inoculum. Therefore, the selected sludge were able to develop the active Anammox biomass in the reactors after cultivation and operation under anoxic and autotrophic conditions. It was also observed that inocula have impact on the composition of the microbial biomass developed in the reactors, but the operating conditions applied play an important role in the selection of Anammox bacteria community.

## SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
SUMÁRIO	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS DA PESQUISA	5
2.1 - Objetivo Geral	5
2.2 - Objetivos Específicos	5
2.3 – Hipóteses	6
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1- Nitrogênio: implicações da contaminação por compostos nitrogenados	8
3.2- Transformações biológicas envolvidas no ciclo do Nitrogênio	10
3.3- Novos processos utilizados na remoção de nitrogênio	14
3.4- Anammox: célula, processo e aplicações	16
3.5- Materiais suporte utilizados no cultivo de bactérias Anammox	25
3.6- Métodos moleculares para detecção e quantificação de microrganismos	25
3.6.1- Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	25
3.6.2- Clonagem	27
3.6.3 - Sequenciamento de nova geração –NGS	28
4 METODOLOGIA	33
4.1- Fluxograma experimental	33
4.2 - Seleção dos inóculos	33
4.2.1- Origem das amostras do inóculo	34
4.2.2- Descrição das unidades de tratamento CePTS e REGAP	34
4.2.2.1- CePTS	34
4.2.2-2- REGAP	38
4.3- Processamento das amostras	41
4.4- Extração de DNA	42
4.5- Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	42

4.6- Eletroforese em gel de agarose	43
4.7- Clonagem, sequenciamento e análise filogenética das amostras selecionadas como inóculos dos reatores.	44
4.8- Análises físico – químicas realizadas nas amostras selecionadas como inóculo dos reatores	45
4.9 - Bioreatores e periféricos	46
4.10 - Inóculo e operação dos biorreatores	48
4.11 - Monitoramento físico-químico dos biorreatores	50
4.12 - Monitoramento microbiológico dos bioreatores por Pirosequenciamento	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1- Introdução	53
5.2 - Seleção dos Inóculos	53
5.3 - Análise da diversidade das bactérias Anammox nos inóculos	57
5.4- Inóculo, operação e desempenho dos biorreatores	61
5.4.1- Caracterização físico-química e inóculo dos reatores	61
5.4.2- Dinâmica de compostos nitrogenados no RI	62
5.4.3- Dinâmica de compostos nitrogenados no R II	69
5.4.4- Coloração da Biomassa em RI e RII	76
5.4.5- Confirmação das bactérias Anammox por PCR utilizando o par de primer HzsA 526f/ HzsA 1857r	77
5.5-Análise da diversidade bacteriana desenvolvida nos reatores pela técnica pirosequenciamento	78
5.5.1- Índices de diversidade	79
5.5.2- Caracterização da diversidade bacteriana nos reatores	81
5.5.2.1- Filos	82
5.5.2.2- Gêneros	89
5.6- Organismos Anammox detectados por pirosequenciamento.	91
5.7- Comparação de resultados obtidos na análise da diversidade bacteriana encontrada em reatores Anammox	94
6 CONCLUSÕES	96
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	98
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Enzimas envolvidas na nitrificação.	12
Figura 3.2	Enzimas envolvidas na desnitrificação.	12
Figura 3.3	Eletromicrografia do anammoxossomo.	17
Figura 3.4	Esquema da rota metabólica da reação Anammox.	18
Figura 3.5	Desenho esquemático da reação em cadeia da polimerase- PCR.	26
Figura 3.6	Desenho esquemático das reações que ocorrem no pirosequenciamento.	30
Figura 4.1	Fluxograma experimental.	33
Figura 4.2	Foto de satélite do CePTS.	35
Figura 4.3	Coleta de amostras no CePTS.	36
Figura 4.4	Desenho esquemático do sistema de tratamento de efluentes líquidos da REGAP.	39
Figura 4.5	Fotos dos pontos de coleta realizada na REGAP.	40
Figura 4.6	Desenho esquemático do aparato experimental.	47
Figura 4.7	Foto do aparato experimental no interior da câmara climatizada com identificação das principais unidades.	47
Figura 5.1	Eletroforese em gel de agarose 1% com o resultado da PCR das amostras dos lodos coletados na REGAP.	54
Figura 5.2	Eletroforese em gel de agarose 1% do resultado da PCR das amostras de lodos coletados na <i>wetland</i> não plantada - CePTS.	56
Figura 5.3	Árvore filogenética das UTOS relacionadas às bactérias <i>Anammox</i> mostrando as posições dos clones obtidos dos lodos <i>wetland</i> e REGAP.	58
Figura 5.4	Dinâmica dos compostos nitrogenados $N-NH_4^+$ e $N-NO_2^-$ afluente e efluente em RI ao longo do período de operação.	63
Figura 5.5	Cinética de remoção dos compostos nitrogenados $N-NH_4^+$ e $N-NO_2^-$ afluente e efluente em RI.	66
Figura 5.6	Percentual de remoção de amônia e nitrito de RI ao longo do período de operação.	68
Figura 5.7	Evolução do coeficiente estequiométricos do nitrito em relação à amônia ( $\Delta N-NO_2 / \Delta N-NH_4$ ) – R- I.	69
Figura 5.8	Concentração afluente e efluente de $N-NH_4^+$ e $N-NO_2^-$ no RII ao longo do período de operação.	70
Figura 5.9	Evolução do coeficiente estequiométrico do nitrito em relação à amônia do R-II ( $\Delta N-NO_2 / \Delta N-NH_4$ .)	72

Figura 5.10	Percentual de remoção de amônia e nitrito de RII ao longo do período de operação.	73
Figura 5.11	Cinética de remoção dos compostos nitrogenados $N-NH_4^+$ e $N-NO_2^-$ afluente e efluente em RII .	74
Figura 5.12	Cargas de nitrogênio ( $N-NO_2^-$ e $N-NH_4^+$ ) afluente e efluente nos reatores RI e RII, ao longo de todo o período operacional.	75
Figura 5.13	Visualização da coloração da biomassa nos reatores. (A) início da operação RI; (B) 370 dias de operação com coloração marrom alaranjada e aspecto granulada em RI; (C) início da operação RII (D) RII após 410 dias de operação (E) Grânulos retirados de RI após 1 ano de operação (F) Grânulos retirados de RII após 1 ano de operação.	76
Figura 5.14	Visualização da biomassa enriquecida em RI após dois anos de operação: (A) Biomassa coletada em frasco (B) reator com material suporte colonizado por biomassa de cor alaranjada (C) material suporte colonizado	77
Figura 5.15	Deteção de bactérias <i>Anammox</i> pela PCR com iniciadores para a subunidade <i>HzsA</i> da enzima hidrazina sintase de bactérias <i>Anammox</i> aos 440 e 510 dias de operação para RI e RII.	78
Figura 5.16	Diagrama representando UTOs comuns e exclusivas para cada reator.	79
Figura 5.17	Composição da comunidade bacteriana revelada por <i>pirosequenciamento</i> em nível de filo das amostras coletadas nos reatores I e II.	82
Figura.5.18	Composição da comunidade bacteriana revelada por <i>pirosequenciamento</i> em nível de gênero das amostras coletadas nos reatores I e II.	83
Figura 5.19	Abundância relativa (A) e número de UTOs analisadas (B) dos dez filós mais representativos da biomassa coletada em RI e RII após 440 dias operação.	84
Figura 5.20	Abundância relativa (A) e número de UTOs analisadas (B) dos gêneros mais representativos da biomassa coletada em RI e RII após 440 dias operação.	90
Figura 5.21	Árvore filogenética mostrando a posição das UTOs relacionadas às bactérias <i>Anammox</i> obtidas pela análise de <i>pirosequenciamento</i> .	92



## LISTA DE TABELA

Tabela 2.1	Hipóteses do trabalho relacionadas aos objetivos específicos.	7
Tabela 3.1	Compostos nitrogenados e respectivos estados de oxidação.	9
Tabela 3.2	Diversidade bacteriana observada em diferentes reatores Anammox.	22
Tabela 3.3	Comparação entre os diferentes tipos de material suporte utilizados para cultivo de bactérias Anammox quanto à constituição, configuração e eficiência do reator.	24
Tabela 3.4	Tabela comparativa de tecnologias de sequenciamento de nova geração.	32
Tabela 4.1	Características das lagoas de polimento.	35
Tabela 4.2	Características dos reatores UASB.	38
Tabela 4.3	Pontos de amostragem de lodo do CePTS e REGAP.	41
Tabela 4.4	<i>Primers</i> utilizados para a detecção de bactérias Anammox.	42
Tabela 4.5	Relação dos métodos analíticos utilizados na análise de lodos selecionados para inóculo dos reatores.	45
Tabela 4.6	Composição do meio mineral autotrófico.	49
Tabela 4.7	Composição das soluções de micronutrientes.	49
Tabela 4.8	Métodos analíticos utilizados.	51
Tabela 5.1	Resultados das amplificações por PCR das amostras coletadas na REGAP.	53
Tabela 5.2	Resultados das amplificações por PCR das amostras coletadas no CePTS.	55
Tabela 5.3	Índices Shannon, Simpson e Chao referente as amostras inoculadas em RI ( <i>wetland</i> -CePTS) e RII (Lagoa aerada - REGAP).	59

Tabela 5.4	Resultados das análises físico - químicas dos lodos selecionados pra inóculos: coletados na Lagoa de Aeração Norte- REGAP e <i>Wetland</i> construída, NP-50 cm – CePTS.	62
Tabela 5.5	Eficiências médias de remoção de nitrogênio durante as fases operacionais de RI.	64
Tabela 5.6	Eficiências médias de remoção de nitrogênio durante as fases operacionais de RII.	71
Tabela 5.7	Resumo de informações obtidas na análise de pirosequenciamento das amostras coletadas em RI e RII após 440 dias de operação.	80
Tabela 5.8	Abundância relativa e número de UTOs não classificados em diferentes níveis taxonômicos revelados por análise de <i>pirosequenciamento</i> .	81
Tabela 5.9	Número de sequências encontradas em cada UTO relacionadas ao <i>gênero C. Brocadia</i> presente nas amostras de reatores I e II analisadas por <i>pirosequenciamento</i> .	93

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANAMMOX	Anaerobic Ammonium Oxidation ou Oxidação Anaeróbia da Amônia
AOB	Aerobic Oxidizing Bacteria ou Bactéria Oxidadora de Amônia
APS	Persulfato de amônio
Aq	Aquoso
ATP	Adenosina Trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CANON	Complete Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
COT	Carbono Orgânico Total
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ou Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DO	Densidade Óptica
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
FISH	Fluorescent in situ Hybridization ou Hibridação in situ Fluorescente
INDEAR	Instituto de Agrobiologia Rosario
kJ	Quilojoule
LB	Luria Bertani
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NOB	Nitrite Oxidizing Bacteria ou Bactéria Oxidadora de Nitrito
PCR	Polimerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RBS	Reator em Batelada Sequencial

## LISTA DE ABREVIATURAS , SIGLAS, SÍMBOLOS

---

RDP	Ribossomal Database Project
RNAr	Ácido Ribonucleico Ribossomal
RPM	Rotações por Minuto
OLAND	Oxigen Limitant Autotrophic Nitrification Denitrification
pb	Par de base
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
SDS	Dodecil sulfato de sódio
RI	Bioreator I
RII	Bioreator II
SHARON	Single Reactor for Ammonium Removal Over Nitrite
ST	Sólidos Totais
STV	Sólidos Totais Voláteis
TAE	Tris acetato EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
UTO	Unidade Taxonômica Operacional
UV	Ultravioleta

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um nutriente essencial para as células, sendo constituinte principalmente das proteínas, ácidos nucleicos. Em excesso, é considerado junto ao carbono e fósforo um dos poluentes mais importantes do ambiente aquático propiciando o crescimento exagerado de algas, bactérias e macrófitas aquáticas nos corpos receptores, ocasionando e acelerando o processo de eutrofização. A eutrofização do ambiente aquático ocorre devido ao lançamento de efluentes ricos em nutrientes, decorrentes do processo desordenado de urbanização dos grandes centros e de sistema ineficaz de coleta, tratamento, destinação e fiscalização desses resíduos.

As fontes de nitrogênio nas águas naturais são diversas. Os esgotos sanitários e fertilizantes constituem a principal fonte. Alguns efluentes industriais contribuem também para as descargas de nitrogênio orgânico e amoniacal nas águas, como algumas indústrias químicas, petroquímicas, siderúrgicas, farmacêuticas, alimentícias, matadouro, frigoríficos e curtumes. A atmosfera é outra fonte importante devido aos diversos mecanismos como a biofixação realizada por bactérias e algas presentes nos corpos hídricos, que incorporam o nitrogênio atmosférico em seus tecidos, contribuindo para a presença de nitrogênio orgânico nas águas.

A amônia é um composto tóxico bastante restritivo à vida dos peixes, muitas espécies não suportam concentrações acima de 5mg /L (REIS & MENDONÇA, 2009). O nitrato é tóxico, provoca a metahemoglobinemia infantil, letal para crianças além de causar danos à saúde animal, enquanto o nitrito pode ser o responsável pela formação de substâncias mutagênicas e carcinogênicas (BAIRD, 2002).

Com todos os impactos conhecidos referentes ao lançamento de compostos nitrogenados nos corpos receptores, era de se esperar um controle rígido voltado à fiscalização quanto às suas concentrações nos efluentes gerados e lançamentos. Porém, em abril de 2008, o Conselho Nacional do Meio Ambiente -CONAMA, editou a Resolução Nº 397/08, por meio da qual modificou os limites estabelecidos como padrão de lançamento, tornando-os menos restritivos. Essa Resolução, que preconizava para o parâmetro nitrogênio amoniacal total o valor máximo de lançamento em 20 mg/L, deixou de ser aplicável como regulador da

qualidade de efluentes finais produzidos por sistemas de tratamento de esgotos sanitários, no entanto, o limite de  $20 \text{ mgN.L}^{-1}$  continuou válido para efluentes industriais. Atualmente, esse limite continua regulamentado pela Resolução CONAMA 430/2011 que substituiu a R 397/08, (BRASIL, 2011).

A remoção de nitrogênio amoniacal, em sistemas de tratamento, tem sido tradicionalmente realizada por meio dos processos microbiológicos de nitrificação e desnitrificação. Porém, desde a sua descoberta (MULDER *et al.*, 1995), o processo de oxidação anaeróbia da amônia - Anammox, ( *Anaerobic Ammonium Oxidation*), no qual o íon amônio é oxidado a nitrogênio gasoso utilizando o nitrito como aceptor final de elétrons (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996), tem se mostrado mais vantajoso quanto ao aspecto econômico e ambiental para o tratamento de águas residuárias contendo altas concentrações de nitrogênio amoniacal e baixa relação C/N, quando comparado ao sistema convencional de nitrificação e desnitrificação (KUENEN, 2008).

Segundo GAO *et al* (2011), a aplicação do processo Anammox reduz em até 90% os custos operacionais que passam de € 3-5  $\text{kg}^{-1}$  N removido para € 0.75  $\text{kg}^{-1}$  N removido; Reduz a necessidade de aeração e aporte de carbono orgânico e demanda área, aproximadamente, 50% menor quando comparado à nitrificação / desnitrificação. Kartal *et al.*, (2010) afirmam que diminui, em média, 90% a emissão de gases relacionados ao efeito estufa, pois o processo consome  $\text{CO}_2$  e não emite  $\text{N}_2\text{O}$  . Além disso, Jetten *et al.*, (2009) argumenta a redução na produção de lodo devido à baixa velocidade de duplicação das bactérias Anammox, reduzindo os custos para tratamento do mesmo.

Foi reportado que a média de remoção de amônia via Anammox é de  $10\text{kgN m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$  em testes de escala plena ( VAN DER STAR *et al.*, 2007) e  $75\text{Kg N m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$  (TANG *et al.*, 2011a) para experimentos em laboratório. Esses valores são maiores quando comparados ao processo de nitrificação/desnitrificação (GAO *et al.*, 2011).

O processo Anammox é realizado por bactérias anaeróbias, quimiolitotróficas, de crescimento muito lento, pertencentes ao grupo dos Planctomicetos e até o momento não foram isoladas espécies em cultura pura (Kartal *et al.*, 2012). Isso faz com que a biologia molecular, seja a principal ferramenta de estudo da diversidade desses organismos.

Entretanto, a aplicação do processo Anammox em todo o mundo tem apresentado alguns desafios. Um deles está relacionado à forma de iniciar os reatores Anammox. Geralmente, a partida dos reatores é realizada inoculando biomassa Anammox ativa, previamente enriquecida.

No Brasil, o estudo deste processo de tratamento é recente e considerado como desafio para sua aplicação no tratamento de efluentes. Porém, alguns trabalhos descreveram o uso de reatores Anammox para o tratamento de efluentes. Reginatto *et al.* (2005) descreveu a capacidade da biomassa de um reator de nitrificação-desnitrificação de atuar na remoção de nitrogênio amoniacal, via processo Anammox, de águas residuárias de esgoto sanitário. Araújo *et al.* (2010) demonstraram enriquecimento de bactérias com atividade Anammox a partir de lodo proveniente da estação de tratamento de esgoto sanitário de Belo Horizonte, MG, e reportaram a predominância de *Ca. Brocadia Anammoxidans*, após seis meses de adaptação, utilizando alimentação sintética com concentrações de até 95 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e até 82 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Kunz *et al.* (2007) obtiveram atividade Anammox a partir de amostra de lodo biológico coletado do tratamento de dejetos de suínos e aumentaram a população de bactérias pela aclimação e imobilização, utilizando efluente sintético, para estimar a capacidade de remoção de nitrogênio. Os autores concluíram que o lodo do sistema de tratamento de efluente da suinocultura foi uma excelente fonte de microrganismos para o desenvolvimento da atividade Anammox.

Porém, a dificuldade associada ao cultivo e manutenção da viabilidade e atividade de grandes quantidades dessas bactérias por um período de tempo prolongado tem sido um grande desafio dos pesquisadores de todo o mundo.

Nesse contexto, a atual pesquisa foi proposta na tentativa de avançar no conhecimento sobre a obtenção de biomassa Anammox. Até o presente momento, têm sido utilizados para a partida dos reatores Anammox lodos provenientes de plantas de tratamento de esgoto sanitário, lodo nitrificante que trata efluente da indústria de fermento, da suinocultura, entre outros. Até onde se tem conhecimento, não existem trabalhos na literatura que utilizaram lodo proveniente de sistemas de tratamento de efluentes da indústria petroquímica no enriquecimento de cultura de bactérias Anammox. Portanto, o presente estudo, como caráter inovador, pesquisou a presença

de bactérias Anammox em lodos provenientes da planta de tratamento de efluente industrial da refinaria de petróleo e em diferentes sistemas de tratamento de efluentes sanitários que pudessem ser utilizados como inóculo de reatores Anammox e assim, avaliar o impacto do tipo de inóculo e condições operacionais no processo de remoção de nitrogênio amoniacal, bem como sobre a comunidade microbiana desenvolvida em dois reatores Anammox.



## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS DA PESQUISA

#### *2.1 - Objetivo Geral*

Avaliar o impacto do tipo de inóculo e das condições operacionais no processo de remoção de nitrogênio amoniacal, bem como sobre a comunidade bacteriana desenvolvida em reatores Anammox.

#### *2.2 - Objetivos Específicos*

1. Investigar a presença de bactérias Anammox em lodos provenientes de diferentes sistemas de tratamento de efluentes (sanitário e industrial) com a finalidade de selecionar inóculos para a partida dos reatores anaeróbios.
2. Cultivar biomassa Anammox nos reatores a partir dos inóculos selecionados.
3. Avaliar e comparar a eficiência do processo Anammox desenvolvido em cada reator frente à aplicação de cargas crescentes de nitrogênio amoniacal.
4. Caracterizar filogeneticamente a comunidade bacteriana desenvolvida em cada um dos reatores.

### **2.3 – Hipóteses**

A estratégia mais promissora de enriquecimento de cultura Anammox em reatores se faz utilizando lodos de ambientes onde já tenha sido detectada a bactéria (através da detecção molecular pela PCR, por exemplo). Entretanto, a seleção do lodo de inóculo para a partida de reatores Anammox é fundamental para diminuir o longo tempo de partida do processo. Todavia, pouca atenção tem sido dada ao efeito da utilização de diferentes tipos de inóculos para a partida dos reatores e suas implicações na eficiência do processo de remoção de nitrogênio amoniacal (DATE *et al.*, 2009). Alguns estudos demonstraram que a utilização de mistura de vários lodos é possível. Chamchoi e Nitisoravut (2007) mostraram que lodos de reatores UASB, lodo ativado e lodo de processo anaeróbio podem ser utilizados como inóculo para o desenvolvimento de reatores Anammox com sucesso.

Considerando que as plantas de tratamento de águas residuárias representam habitats de mudança contínua quanto à composição química e que geram um efluente rico em amônia, seria interessante avaliar a capacidade desse lodo em enriquecer uma cultura Anammox suficientemente capaz de tratar esse efluente. Em refinarias de petróleo, o efluente difere diariamente em termos de concentração e composição de compostos poluentes, incluindo a fração de alifáticos e hidrocarbonetos aromáticos de petróleo, organoclorados originados de líquidos de refrigeração utilizados no processo industrial e outros compostos, tais como fenol, cloretos, sulfitos, hidróxido de sódio, amoníaco e metais pesados (SILVA *et al.*, 2012).

Assim, avaliar o impacto dos diferentes tipos de inóculos e condições operacionais sobre o desenvolvimento, estabilidade e tolerância do processos Anammox, a composição da comunidade bacteriana selecionada em reatores Anammox contribuirá efetivamente para a otimização do processo.

Portanto, optou-se neste trabalho por escolher lodos distintos para serem testados como inóculos dos reatores Anammox, sendo um oriundo de sistema de tratamento de esgoto sanitário e, o segundo, oriundo da planta de tratamento de efluente industrial de uma refinaria de petróleo a qual trata efluentes com concentrações de amônia mais elevadas.

Tal cenário norteou a elaboração das seguintes hipóteses: **Tabela 2.1.**

A **Tabela 2.1** apresenta as hipóteses deste trabalho, as quais foram relacionadas com os objetivos específicos apresentados no item 2.2.

**Tabela 2-1** – Hipóteses do trabalho relacionadas aos objetivos específicos

Hipóteses	Objetivos Específicos
<p>I. Existem bactérias Anammox nos lodos provenientes de estação de tratamento de esgoto doméstico e do esgoto industrial da refinaria de petróleo, capaz de enriquecer cultura Anammox em biofiltros.</p>	1e 2
<p>II. Reatores Anammox inoculados com lodos de estações de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo, as quais tratam concentrações de amônia mais elevadas quando comparadas às ETEs de esgoto doméstico, apresentam maior estabilidade e tolerância frente ao aumento de carga afluente de nitrogênio amoniacal.</p>	1, 2 e 3
<p>III. Inóculos distintos promovem o desenvolvimento de comunidades bacterianas similares nos reatores Anammox quando submetidos às mesmas condições de operação.</p>	4

## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### ***3.1 – Nitrogênio: implicações da contaminação por compostos nitrogenados***

O nitrogênio é um nutriente essencial para a vida. A maior parte do nitrogênio da terra existe sob a forma de nitrogênio gasoso ( $N_2$ ), constituindo 78% do ar atmosférico. Porém, não está diretamente disponível para a biota terrestre, dependendo das reações de fixação, assimilação e degradação. No ciclo ambiental do nitrogênio as formas disponíveis dependem da decomposição biológica do mesmo, acumulado nos seres vivos.

Quando em excesso, os compostos nitrogenados podem causar sérios problemas aos ambientes aquáticos, ocasionando a sua deterioração. Nesse sentido, este é um dos contaminantes mais importantes junto ao carbono e fósforo. Eles são encontrados em diversos tipos de águas residuárias tanto urbanas quanto agrícolas ou industriais.

Os compostos nitrogenados se apresentam em estado de oxidação que podem variar das formas mais reduzidas -3 ( $NH_3/NH_4^+$ ), até as mais oxidadas +5 ( $HNO_3/NO_3^-$ ). No ambiente, as formas predominantes são: nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal ( $NH_4^+$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ) e nitrogênio gasoso ( $N_2$ ). Os compostos mais estáveis são o ânion nitrato e o cátion amônio que podem criar graves problemas de toxicidade. A **Tabela 3.1** apresenta as espécies de compostos nitrogenados.

Um dos problemas associados ao descarte de compostos nitrogenados em meio aquoso (aq), junto ao fósforo e micronutrientes, é o desenvolvimento de algas que posteriormente se decompõem, provocando a eutrofização. O crescimento descontrolado dessa biomassa pode levar ao esgotamento de nutrientes e início da morte massiva das algas. Essa decomposição em condições aeróbias provoca a diminuição do oxigênio dissolvido comprometendo a vida aquática. Na ausência de oxigênio a biomassa é degradada anaerobicamente gerando o excesso de matéria orgânica

comprometendo a qualidade da água. Por outro lado a contaminação do ambiente aquático por nitrogênio amoniacal ocasiona efeitos imediatos como mortandade de peixes (REIS & MENDONÇA, 2009).

**Tabela 3.1** – Compostos nitrogenados e respectivos estados de oxidação

Composto	Fórmula	Estado de oxidação
Amônia/Amônio	$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$	-3
Nitrogênio orgânico	$\text{NH}_2$	-3
Hidrazina	$\text{N}_2\text{H}_4$ (aq)	-2
Hidroxilamina	$\text{NH}_2\text{OH}$ (aq)	-1
Nitrogênio gasoso	$\text{N}_2$ (g)	0
Óxido nitroso	$\text{N}_2\text{O}$ (g)	+1
Óxido nítrico	$\text{NO}$ (g)	+2
Nitrito	$\text{HNO}/\text{NO}_2^-$	+3
Dióxido de nitrogênio	$\text{NO}_2$ (g)	+4
Nitrato	$\text{HNO}_3/\text{NO}_3^-$	+5

Fonte: Adaptado MADIGAN *et al.*, 2010.

A amônia está presente naturalmente nos corpos d'água como produto da degradação de compostos orgânicos e inorgânicos do solo e da água, como resultado da excreção da biota. É constituinte comum no esgoto sanitário, como resultado direto de descargas de efluentes domésticos e industriais, da hidrólise da ureia e da degradação biológica de aminoácidos e outros compostos orgânicos nitrogenados (REIS & MENDONÇA, 2009). Em soluções aquosas, a amônia pode se apresentar sob as formas ionizadas ( $\text{NH}_4^+$ ) ou não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), considerada a espécie mais tóxica. O equilíbrio entre as diferentes espécies de amônia depende das características físicas e químicas dos corpos d'água. Elevações do pH ou da temperatura deslocam o equilíbrio químico no sentido da amônia não ionizada. Embora a concentração de ( $\text{NH}_3$ ) cresça com o aumento do pH e temperatura, sua toxicidade diminui (BAIRD, 2002).

A amônia é um dos problemas dos sistemas aquáticos por consumir oxigênio pra ser oxidado a nitrito e posteriormente a nitrato no processo de nitrificação (4,6 mg de oxigênio para cada miligrama de amônia oxidada a nitrato). Esse processo, ocorrendo

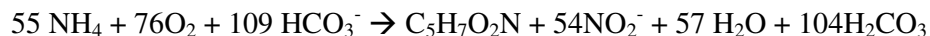
em excesso, gera um consumo elevado de oxigênio e consequente diminuição do oxigênio dissolvido, provocando a morte dos organismos aeróbios.

O nitrato e nitrito também podem ser tóxicos para os mamíferos ao serem reduzidos no trato intestinal. O nitrito se combina com aminas para formar N-nitrosaminas que são carcinogênicas, podendo ser mutagênicas (BAIRD, 2002). Pode combinar-se com a hemoglobina, proteína do sangue que transporta o oxigênio para os tecidos, formando a metahemoglobina que é incapaz de transportar o oxigênio ocasionando anemia severa.

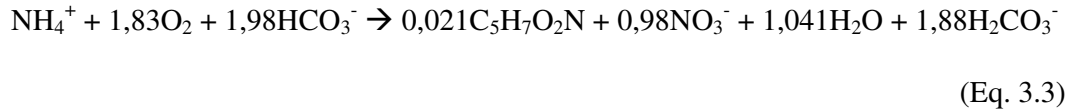
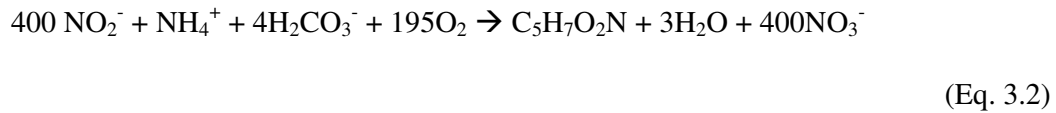
### **3.2 – Transformações biológicas envolvidas no ciclo do Nitrogênio**

Predominantemente, para a eliminação dos compostos nitrogenados das águas residuárias são utilizados processos físico-químicos e biológicos, sendo os biológicos mais efetivos e relativamente mais baratos e, por isso, mais amplamente aplicados. Os principais métodos físico-químicos de remoção de nitrogênio das águas residuárias incluem a diluição da água residuária, *stripping* e troca iônica (METCALF & EDDY, 2003). Embora esses métodos sejam eficientes, eles apresentam custos elevados, requerem adição de produtos químicos, não eliminam nitrito, nitrato nem nitrogênio orgânico e podem liberar compostos tóxicos no ambiente. Esses fatores são os principais responsáveis pela preferência na utilização de processos biológicos para a remoção de nitrogênio. Esses sistemas de tratamento biológico tem sido tradicionalmente realizados pela nitrificação seguida pela desnitrificação.

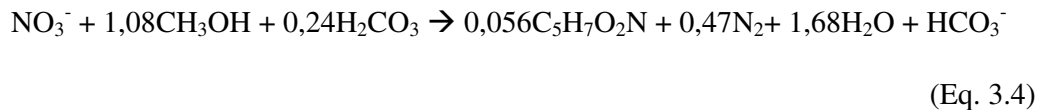
A nitrificação implica na oxidação quimiolitotrófica da amônia a nitrato, sob condições aeróbias estritas, e é conduzida em dois estágios sequenciais: oxidação da amônia a nitrito e oxidação de nitrito a nitrato. Na etapa autotrófica, a nitrificação é aeróbia, onde o O<sub>2</sub> é utilizado como acceptor final de elétrons, o amônio é oxidado a nitrito e este a nitrato. As **Equações 3.1 e 3.2** representam o processo de oxidação aeróbia da amônia e do nitrito, respectivamente (AHN, 2006). A equação global para a nitrificação está representada na **Equação 3.3**.



(Eq. 3.1)



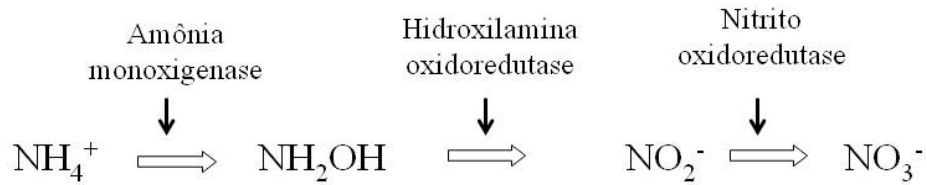
Na desnitrificação heterotrófica ocorre a conversão de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{N}_2$ . Essa etapa ocorre na presença de fonte de matéria orgânica e ausência de oxigênio dissolvido (condições anóxicas), como pode ser observado na **Equação 3.4**.



Cada estágio é realizado por gêneros de bactérias diferentes, que utilizam amônia ou nitrito como fonte de energia, oxigênio molecular (exceto na desnitrificação) como acceptor de elétrons, e compostos de carbono inorgânico (como  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$ ) como fonte de carbono.

Os organismos nitrificantes se dividem em dois grandes grupos: as bactérias oxidadoras de amônia AOB (*ammonium oxidizing bacteria*) e as bactérias oxidadoras de nitrito NOB (*nitrifying oxidizing bacteria*). Uma característica importante desses microrganismos é que o produto final das AOB é substrato das NOB (MADIGAN *et al.*, 2010).

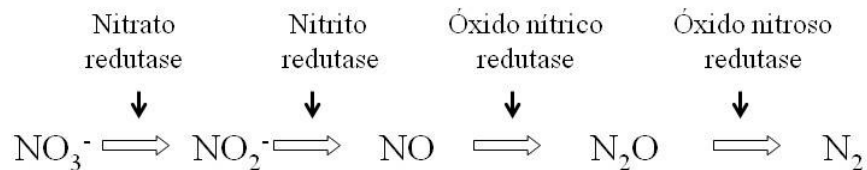
Na conversão da amônia a nitrito as bactérias amônio oxidantes transformam o amônio em hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) com a ação da enzima amônia mono-oxigenase (AMO) localizada na membrana celular. Em seguida convertem a  $\text{NH}_2\text{OH}$  em nitrito catalisado pela enzima hidroxilamina óxido redutase (HAO) durante essa etapa ocorre o maior consumo de oxigênio dissolvido. A oxidação do nitrito a nitrato é realizado pelas bactérias nitrito oxidantes catalisado pelo complexo enzimático óxido redutase (NOR) (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1** – Enzimas envolvidas na nitrificação

Espécies de microrganismos pertencentes ao gênero *Nitrosomonas* oxidam  $\text{NH}_4^+$  à  $\text{NO}_2^-$  e *Nitrobacter* que oxidam  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ , são as principais representantes dessas etapas.

Na desnitrificação heterotrófica, os íons nitrito e nitrato são reduzidos a nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ). Esse processo é realizado geralmente por bactérias heterotróficas que utilizam nitrito ou nitrato como aceptores de elétrons e matéria orgânica como fontes de carbono e energia. Os produtos intermediários são nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) e óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). **Figura 3.2**



**Figura 3.2** – Enzimas envolvidas na desnitrificação

A desnitrificação é realizada por vários gêneros de bactérias: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Acinetobacter*, *Thiobacillus*, dentre outros (BITTON, 2005).

Algumas bactérias quimiolitotróficas são conhecidas por serem capazes de utilizar o nitrato comoceptor de elétrons e uma fonte de energia inorgânica ( $\text{H}_2$  ou  $\text{S}^0$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^-$ ), esse processo tem sido pouco aplicado em estações de tratamento de esgotos domésticos porque a maioria das águas residuárias contém matéria orgânica suficiente para a desnitrificação heterotrófica. No entanto, para remover compostos nitrogenados em sistemas de pós-tratamento de efluentes com baixas concentrações de matéria orgânica, existe o processo de desnitrificação autotrófica, favorável devido a duas vantagens comparadas aos processos biológicos heterotróficos. Primeiramente, não é



necessária adição de fonte externa de carbono orgânico (metanol, etanol, etc), diminuindo os custos do processo, associado a menor produção de lodo, devido a menor produção de biomassa (JETTEN *et al.*, 2009).

A redução desassimilatória do nitrato é realizada em duas etapas. A respiração do nitrato, consiste na redução do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), seguida pela redução do nitrito ao íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Ocorre na ausência de oxigênio, diminui o excesso de potencial redutor e produz amônia para assimilação e crescimento celular anaeróbio. O processo ocorre em ambientes redutores, como sedimentos anaeróbios marinhos, fontes termais ricas em sulfeto ( $\text{S}_2^-$ ), trato gastrointestinal humano e de animais de sangue quente (BOTHE *et al.*, 2007).

A redução assimilatória do nitrato, e a redução desassimilatória está relacionado à redução do nitrato a íon amônio, para biossíntese celular. Este processo ocorre tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias e o produto, íon amônio, não é excretado para o meio extracelular. A quantidade de nitrogênio reduzido nesse processo depende da demanda de biomassa. Quando existe grande concentração do íon amônio o processo é inibido (TIEDJE, 1982 apud PEREIRA, 2013).

A amonificação corresponde ao processo inverso à assimilação da amônia, em que os compostos nitrogenados liberados das células sofrem hidrólise por meio de enzimas microbianas, resultando na liberação de grupos amina, que resulta na produção de nitrogênio reduzido sob duas formas: amônia livre ( $\text{NH}_3$ ) ou ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) (BOTHE *et al.*, 2007).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste na redução de nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) a íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Esse processo é essencial para obtenção de fonte de nitrogênio para as necessidades biossintéticas celulares. Consiste em um processo anabólico, e os microrganismos capazes de realizar tal processo são livres da dependência das formas fixadas de nitrogênio, como amônia ou nitrato, conferindo-lhes uma vantagem ecológica significativa (MADIGAN *et al.*, 2010).

Alguns procariotos são capazes de fixar  $\text{N}_2$ ; alguns de vida livre e outros dependentes da associação com plantas. Os microrganismos de vida livre são 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. A importância da fixação biológica de nitrogênio está associada à disponibilização de formas assimiláveis desse composto para outros organismos, como animais e plantas. (MADIGAN *et al.*, 2010).

### **3.3 - Novos processos utilizados na remoção de nitrogênio**

Vários estudos tem apresentado pesquisas sobre processos não-convencionais de remoção de nitrogênio (VERSTRAETE & PHILIPS, 1998 APUD MISSAGIA, 2010). Os sistemas de nitrificação onde o íon amônio é parcialmente convertido a nitrito (impedindo a formação de nitrato), tais como OLAND (*Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification*), SHARON (*Single Reactor High Activity Ammonium Removal Over Nitrite*) e CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*) podem ser associados à desnitrificação autotrófica pela oxidação anaeróbia da amônia. Assim, o processo torna-se mais viável economicamente, uma vez que não há necessidade de adição de nitrito ou fonte externa de carbono, comparado ao processo tradicional (FUX *et al.*, 2002).

O processo SHARON aplica a interrupção nos processos de nitrificação e desnitrificação. A nitrificação é interrompida na etapa intermediária, mantendo o nitrogênio na forma de nitrito e a conversão de nitrito a nitrogênio gasoso ocorre na etapa seguinte. Há economia de energia e doadores de elétrons para a desnitrificação. Utiliza-se o fato de que em altas temperaturas, as NOB têm crescimento mais lento que as AOB. Devido ao curto tempo de detenção hidráulica (TDH) (aproximadamente um dia) e à alta temperatura (35°C), as NOB são excluídas do reator. A temperatura, associada ao curto TDH, é um fator de seletividade, pois a 35°C a máxima velocidade de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de NOB é aproximadamente a metade comparada a das AOB (JETTEN *et al.*, 2001a).

O processo OLAND ocorre quando o oxigênio é fornecido estequiometricamente para

que a nitrificação ocorra até nitrito e, então, devido à escassez de aceptores de elétrons, o nitrito formado é consumido para oxidar o restante do amônio. Este processo comparado ao processo de nitrificação e desnitrificação convencional permite uma economia com aeração de 62,5% e 100% com ausência de agente redutor (fonte de carbono orgânico). No OLAND a oxidação direta de amônio a nitrogênio gasoso pode ser alcançada em uma única fase (VERSTRAETE & PHILIPS, 1998 APUD, MISSAGIA, 2010).

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

Recentemente, Chen *et al.* (2009) desenvolveram o processo conhecido como SNAD (*Simultaneous Nitrification, Anammox and Denitrification*) para remoção de nitrogênio e remoção de DQO em um único reator, no qual a maioria do nitrogênio é removida por Anammox. Esse processo promove a interação de nitrificantes aeróbios, Anammox e desnitrificantes sob condições limitadas de oxigênio com um potencial para fazer a remoção de amônia e carbono orgânico a N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Contudo, as condições ótimas para o enriquecimento desses microrganismos ainda não são bem-compreendidas (LAN *et al.*, 2011).

Mulder *et al.*, (1995) observaram a perda de amônia em um reator desnitrificante de leito fluidizado, em Delft (Holanda). Esse processo de oxidação anaeróbia da amônia, no qual a amônia é oxidada a nitrogênio gasoso sob condições anóxicas, foi denominado *Anaerobic ammonium oxidation* (ANAMMOX). A descoberta desse processo alterou o ciclo convencional do nitrogênio, uma vez que se considerava que a oxidação da amônia só seria possível em condições aeróbias.

### **3.4 - Anammox: célula, processo e aplicações**

O processo Anammox foi descoberto em 1995 por Mulder e colaboradores em um reator desnitrificante de leito fluidizado aplicado ao tratamento de efluentes de um reator metanogênico, operado para degradação de resíduos da planta de produção de fermento, em Delft na Holanda (MULDER *et al.*, 1995). Esse processo implica na oxidação anaeróbia da amônia na qual o íon amônio é oxidado a nitrogênio gasoso usando o nitrito como acceptor final de elétrons (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996). O processo Anammox é realizado por bactérias anaeróbias, quimiolitotróficas, de crescimento muito lento, pertencentes ao grupo dos *Planctomyces* e até o momento não existe uma única espécie que tenha sido isolada em cultura pura (KARTAL *et al.*, 2011).

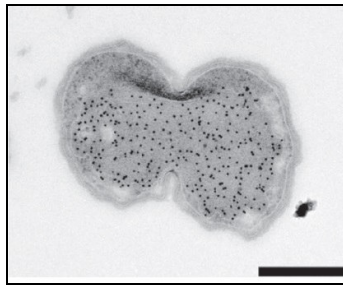
Os organismos Anammox estão classificados no filo dos *Planctomyces*, ordem Brocaciales, e até o momento foram identificados cinco *Candidatus* a gêneros “*Kuenenia*”, “*Brocadia*” “*Anammoxoglobus*”, “*Jettenia*”, “*Scalindua*”. O número de espécies descritas tem aumentado e até o momento temos: *Candidatus Brocadia*: *B. Anammoxidans*: *B. fulgida*, *B. sinica*, *Candidatus Kuenenia*: *K. stuttgartiensis*; *Candidatus Scalindua*: *S. wagneri*, *S. brodae* e *S. sorokinii* e *S. arábica* ; *Candidatus Jettenia asiatica* e *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* ( JETTEN *et al.*, 2009), e mais recentemente, *B. caroliniensis* (VANOTTI *et al.*, 2011): *B. brasiliensis* (ARAÚJO *et al.*, 2011).

As Anammox apresentam morfologia de cocos com diâmetro, em média, menor que 1 µm (07 a 1,3µM), coram-se como gram negativas. Não formam endósporos, não apresentam motilidade. Obtém energia por meio da oxidação anaeróbia da amônia e carbono por meio da fixação de CO<sub>2</sub>, oxida ácidos orgânicos (formiato, acetato, propionato), são catalase e peroxidase positiva; o tempo de duplicação é de aproximadamente 11 dias e são fisiologicamente distintas dos outros membros dos Planctomicetos por serem anaeróbias e quimiolitotróficas (JETTEN *et al.*, 2009).

Essas características estão relacionadas às vantagens do processo Anammox sobre a combinação tradicional de nitrificação e desnitrificação para tratamento de efluente. As

principais vantagens são: a não demanda de oxigênio e a ausência de necessidade de fonte externa de carbono, pois o processo é autotrófico. E a desvantagem estaria relacionada à baixa velocidade de crescimento das bactérias Anammox, o que retarda o início do processo (EGLI *et al.*, 2001). Por outro lado, esta mesma característica seria responsável pela baixa produção de lodo ; considerada grande vantagem à sua disposição final.

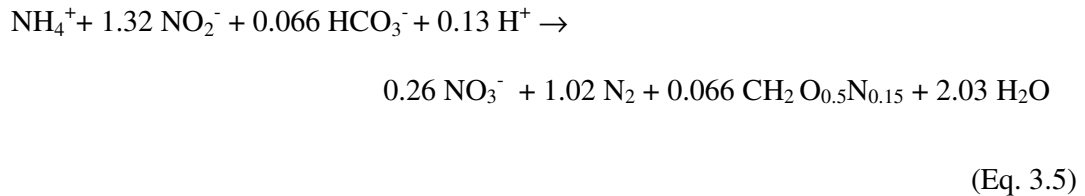
Estudos com microscopia eletrônica de transmissão de *B. Anammoxidans* mostraram no citoplasma desta bactéria compartimentos limitados por membranas (**Figura 3.3**). A enzima hidroxilamina oxidoreductase (HAO), responsável pela oxidação de hidrazina a gás N<sub>2</sub>, se encontrava exclusivamente dentro de um compartimento, denominado de “Anammoxosomo” (JETTEN *et al.*, 2001a).



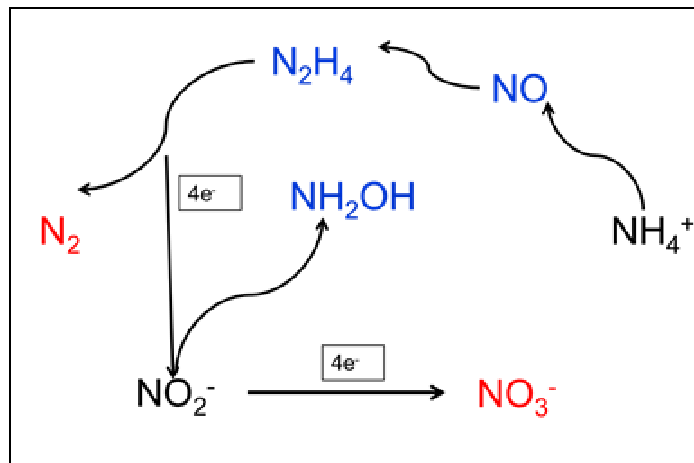
**Figura 3.3** – Eletromicrografia mostrando, nos pontos pretos, a distribuição da hidrazina/ hidroxilamina oxidoreductase no Anammoxosomo da “*Candidatus kuenenia stuttgartiensis*” (escala da barra- 500nm). ( Fonte: JETTEN *et al.*,2009)

A membrana do Anammoxosomo é usada para gerar e manter uma força motriz de prótons para a síntese de ATP, além de isolar os intermediários (que são tóxicos) do processo Anammox, (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004). As condições ambientais para as Anammox foram determinadas por Strous *et al.* (1999b). A temperatura de crescimento ocorreu entre 20 e 43°C (sendo a temperatura ótima de 38°C), e pH na faixa de 6,7 – 8,7 (com pH ótimo igual a 8). Concentrações de amônio e nitrato em torno de 100mM não inibem o processo Anammox. Porém, concentrações de nitrito acima de 20mM (280mg de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/m<sup>3</sup>) inibiram o processo, sendo que concentrações maiores que 10mM se mostraram desfavoráveis. A permanência da concentração de nitrito acima de 5mM (70mg de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ m<sup>3</sup>) por 12 horas, é suficiente pra inibir a atividade Anammox completamente.

O balanço total de nitrogênio apresenta a proporção de 1: 1,32: 0,26 para a conversão de amônio e nitrito e produção de nitrato (STROUS *et al.*, 1998). A equação geral da reação Anammox, está escrita na **Equação 3.5**.



Na rota metabólica de conversão da amônia a nitrogênio gasoso sob anaerobiose sugerida por JETTEN *et al* (2002), baseada em experimentos com <sup>15</sup>N, foi postulado que a bactéria Anammox reduz nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH), em seguida, hidroxilamina e amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) são condensados a hidrazina (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) e água. Na etapa seguinte, a hidrazina é oxidada a nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) e os elétrons são utilizados para reduzir a próxima molécula de nitrito. Porém parte do nitrito é convertida a nitrato, produzindo equivalentes de redução para fixação do CO<sub>2</sub> utilizado pelas bactérias para biossíntese celular. Atualmente, KARTAL *et al* (2011), demonstrou a participação do óxido nítrico como precursor da hidrazina. Um esquema simplificado desse mecanismo está representado na **Figura 3.4**.



**Figura 3.4-** Esquema da rota metabólica da reação Anammox

Vários trabalhos têm reportado a detecção e identificação de bactérias Anammox em diferentes ambientes, nas diversas partes do mundo, tais como em lodos oriundos de

sistemas de tratamento de águas residuárias (SCHMID *et al.*, 2003; DAPENA-MORA *et al.*, 2004), em sedimentos marinhos, em ambientes de água doce (JETTEN *et al.*, 2009) e em águas salobras (SANCHEZ-MELSIÓ *et al.*, 2009), em reservatórios de petróleo (LI *et al.*, 2010).

Entretanto, a aplicação do processo Anammox em todo o mundo tem apresentado alguns desafios para sua implantação. Um deles está relacionado à forma de iniciar os reatores Anammox. Geralmente, a partida dos reatores é realizada inoculando biomassa Anammox ativa, previamente enriquecida..

No Brasil, o estudo do processo Anammox é considerado como desafio para sua aplicação no tratamento de efluentes, devido à dificuldade de se obter biomassa Anammox enriquecida, e estável por longo período. Uma vez que a maioria dos sistemas em escala plena se encontra na Europa (Holanda, Japão, Suíça, Austria, China, Reino Unido, Alemanha).

Alguns estudos realizados por Kunz *et al.* (2008) investigaram o processo ANAMMOX, considerando-o uma opção de baixo custo para ser aplicado na remoção de amônia, com objetivo de aplicação em tratamento de efluentes da suinocultura.

Agnes *et al.* (2008), avaliaram o aumento de carga e a capacidade de remoção de nitrogênio de um meio de cultura sintético, por um reator contendo meio suporte polimérico não biodegradável em forma de rede em seu interior. Os reatores estudados tiveram um fluxo de alimentação contínuo. As progressões de carga foram determinadas pelo aumento de vazão de alimentação do reator (2,0 a 18,0 L d<sup>-1</sup>). Verificou-se a capacidade de resposta de remoção da carga de nitrogênio aplicada ao reator, principalmente em vazões mais altas, com remoções acima de 80%. A carga de nitrogênio removida pelos reatores de volume útil de 2 litros chegou a aproximadamente 2,3 kg de N m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

Viancelli *et al.* (2009) confirmaram, após análise de grânulos dos reatores inoculados com dejetos de suínos, a presença de bactérias com atividade ANAMMOX.

Estudar a sucessão da população de Anammox ao longo do período de operação dos reatores em configurações e/ou inóculos diferentes podem promover grandes avanços na biologia /aplicação do processo Anammox (VAN DER STAR *et al.*, 2008).

Algumas divergências quanto a eficiência da atividade Anammox, comunidade microbiana envolvida e tipos de inóculos utilizados nos reatores têm norteado temas para várias pesquisa.

Date *et al.* (2009) obteve atividade Anammox utilizando como inóculo dos reatores três tipos de lodos diferentes (lodo de uma estação de tratamento de esgoto doméstico, lodo do tanque de digestão anaeróbia e lodo nitrificante). Os resultados da análise filogenética (RNAr 16S) indicaram a presença de diversas bactérias Anammox a partir de cada tipo de lodo utilizado como inóculo. A diversidade bacteriana das Anammox foi maior na cultura enriquecida a partir do lodo proveniente da estação de tratamento de esgoto doméstico, em relação aos outros tipos de inóculos usados. No reator inoculado com o lodo de esgoto, houve coexistência de *Bacillus sp.* com a cultura Anammox. A presença de *Bacillus sp.* pode resultar na criação de um ambiente ideal para as bactérias Anammox, uma vez que que podem remover o oxigênio dissolvido do meio e o carbono orgânico. Os resultados indicaram que as diferenças da comunidade Anammox na cultura enriquecida, em cada um dos reatores, estavam diretamente relacionadas ao tipo de lodo utilizado como inóculo .

No trabalho realizado por Park *et al.* (2010) um reator em batelada sequencial (RBS), foi inoculado com lodo granular Anammox obtido de um reator Anammox operado em escala de bancada. Um segundo reator foi inoculado com lodo oriundo do sistema de lodos ativados e operado como reator CANON. Esse RBS apresentou sucessão populacional ao longo do tempo de operação. No inóculo original, a população de bactérias Anammox era constituída por *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*. Durante o pré enriquecimento a população passou a ser constituída por *Ca. Brocadia fulgida* . Durante a operação, a população foi substituída, por *Ca. Brocadia sp.*40. Por sua vez, o reator CANON, inoculado com lodo ativado, inicialmente apresentou baixa concentração de bactérias Anammox. No entanto, o enriquecimento de população Anammox se mostrou



intimamente relacionada com *Ca. Brocadia* sp. 40. Apesar de receberem inóculos distintos os dois reatores apresentaram comunidades semelhantes.

Esses resultados contrastam àqueles obtidos por Date *et al.* (2009), onde diferentes inóculos resultaram em populações distintas de bactérias Anammox cultivadas em reatores operados de forma semelhante. PARK *et al.* (2010) sugeriram que a composição do inóculo e as concentrações de substrato existentes nos reatores podem desempenhar um papel importante na seleção da população bacteriana que irá se desenvolver.

As diversas abordagens e divergências mostram a relevância dos estudos da ecologia das bactérias Anammox em ambientes naturais e impactados com diferentes configurações e condições experimentais para desvendar as particularidades que envolvem o enriquecimento e o nicho ecológico das oxidadoras anaeróbias de amônia.

Pouco se conhece sobre o efeito da utilização de diferentes tipos de inóculos em reatores e suas implicações na eficiência do processo de remoção de nitrogênio amoniacal.

Determinar o impacto das diferentes estratégias de inóculo e operação de bioreatores sobre a composição da comunidade microbiana/ Anammox pode contribuir para a otimização do processo Anammox . Estudar a sucessão da população de Anammox ao longo do período de operação dos reatores promoverá grandes avanços na biologia /aplicação do processo Anammox (VAN DER STAR *et al.*, 2008), contribuindo para o isolamento e cultivo dessas bactérias por métodos tradicionais em microbiologia.

A **Tabela 3.2** mostra a diversidade microbiana observada em diferentes reatores Anammox.

**Tabela 3.2.** Diversidade bacteriana observada em diferentes reatores Anammox

Tipo de inóculo e reator	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> no efluente (mg/L)	Diversidade de bactérias (porcentagens da biblioteca) <sup>a</sup>	Quantificação de Anammox	Referencia Citação
Lodo proveniente de reator de desnitrificação; material suporte TNT	250	Anammox 38%; <i>Chlorobi</i> 7%; <i>Proteobacteria</i> 55%	72.8% (PCRq) <i>Brocadia</i> (KSU-1)	Fujii <i>et al.</i> , 2002
Lodo proveniente de reator em Biodisco; Tratamento de lixiviados de aterro de resíduos perigosos	100-500	<i>Planctomycetes</i> ; <i>Proteobacteria</i> ; <i>Firmicutes</i> (nenhuma Anammox) Por FISH: <i>Bacteroidetes</i> 7.6%, <i>Nitrosomonas</i> 30%; Anammox 33%; <i>Nitrospira</i> 5%	10-28% (FISH) <i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	Egli <i>et al.</i> , 2003 (4)
Lodo Nitrificante de WWTP, Reator anoxic gas-lift 10 L <sup>b</sup>	Não mencionado	Anammox 2%; <i>Chlorobi</i> 36%; <i>Proteobacteria</i> 31%; <i>Bacteroidetes</i> 15%; <i>Chloroflexi</i> 13%	73% (FISH) <i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	Strous <i>et al.</i> , 2006
Lodo de reator em biodisco (25% de remoção total de Nitrogênio)	1.4- 4.6 mM <sup>c</sup>	<i>Betaproteobacteria</i> 27% ( <i>Acidovorax sp.</i> , <i>Dechloromonas sp.</i> ); others not mentioned (no Anammox)	2-36% (FISH) <i>Candidatus Brocadia</i>	Tsushima <i>et al.</i> , 2007 (1)
Lodo domestico WWTP, Biofilme de reator de leito fixo e fluxo ascendente	20-550	Anammox 58.5%; <i>Betaproteobacteria</i> 41.5% ( <i>Thauera sp.</i> and <i>Acidovorax sp.</i> )	72-89% (FISH) <i>Ca. Brocadia</i> and <i>Kuenenia</i>	Tsushima <i>et al.</i> , 2007 (5)
Lodo anaeróbico de WWTP municipal, reator anaeróbico de fluxo ascendente <sup>d</sup>	50-1000	<i>Chlorobi</i> 54%; <i>Proteobacteria</i> 13%; <i>Bacteroidetes</i> 11%; <i>Chloroflexi</i> 9%; nenhuma Anammox	16% (qPCR) <i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	Li <i>et al.</i> , 2010
Lodo de esgoto, reator cilíndrico preenchido com <i>nonwoven fabric</i>	170-2000	<i>Bacillus spp</i> (75 %). Bactéria Anammox (% não mencionada)	81 to 94% (FISH); <i>Brocadia fulgida</i> and <i>Brocadia Anammoxidans</i>	Date <i>et al.</i> , 2009 (2)
Biomassa Anammox, reator granular em leito fixo e fluxo ascendente	60-300	33.3% Anammox; 35% <i>Chloroflexi</i> ; 1 clone related to <i>Denitratisoma oestradiolicum</i> , 1 clone <i>Nitrosomonas spp.</i>	80.6% (FISH) <i>Ca. Brocadia</i>	Cho <i>et al.</i> , 2010 (3)
Lodo granular Anammox reator anaeróbico de fluxo ascendente <sup>d</sup>	200	Anammox, <i>Burkholderia</i> 8%, <i>Chloroflexi</i> 6.7%, <i>Nitrosomonas sp.</i> 6%, <i>Methylomirabilis oxifera</i> (6%); methanogens (% not mentioned)	50% (PCRq) <i>Ca. Jettenia asiatica</i>	Hu <i>et al.</i> , 2010
Lodo ativado de ETE esgoto sanitário, RBS	30-300	<i>Proteobacteria</i> (25.0%); <i>Chloroflexi</i> (19.0%), GN04 (15%), <i>Acidobacteria</i> (2,3%), <i>Planctomycetes</i> (15.0%), <i>Bacteroidetes</i> (0,4%), <i>Nitrospirae</i> (0.4%), OP11 (0,3%), <i>Chlorobi</i> (1.6%).	12,2% <i>Ca. Brocadia</i> (pirosequenciamento)	Pereira, A. D. 2013

<sup>a</sup> Fragmentos de DNAr16S foram amplificados pelos primers Pla46F-1390R, exceto em 5 estudos [1,2,3,4,5], os quais foram utilizados os primers universais para bactéria: 6F-1510R, 11F-1387R, 27F-1492R, 341f-926r, respectivamente.

<sup>b</sup> Esses resultados foram uma análise comparativa de todas as sequências recuperadas de estudos de metagenômica.

<sup>c</sup> Estas concentrações foram utilizadas em testes de batelada.

<sup>d</sup> Todos os resultados foram obtidos por pirosequenciamento 454.

### **3.5 – Materiais suporte utilizados no cultivo de bactérias Anammox**

A imobilização da biomassa é um aspecto extremamente importante no cultivo de bactérias em reatores principalmente quando existe a necessidade de alta capacidade de retenção celular devido ao lento crescimento microbiano. A adesão dessas células está diretamente relacionada às características do meio suporte. Atualmente diversos materiais que auxiliam na retenção da biomassa encontram-se disponíveis, entre os quais esponjas de polietileno, biofix, gel de polivinil álcool/alginato, espuma de *non woven*, poliuretano e partículas de zeólito.

A esponja de polietileno (PE sponge) possui alta capacidade de retenção de biomassa. No trabalho desenvolvido por ZHANG *et al.* (2010), esse material foi utilizado como suporte em reatores cilíndricos de fluxo ascendente, com altas taxas de imobilização de bactérias Anammox e de eficiência na remoção do nitrogênio (superior a 85%).

O biofix é uma rede composta por fibras de resina acrílica que também reteve de forma eficiente a biomassa em um reator cilíndrico de fluxo ascendente no trabalho publicado por QIAO *e at.*, (2009).

As esferas de gel de polivinil álcool (PVA) utilizado por QUAN *e at.* (2011) em um reator de tanque agitado mostraram redução significativa no período de *start up* (22 dias), com eficiência de remoção de nitrogênio de até 91%.

PHILIPS (2008) estudou o estabelecimento do processo de remoção de nitrogênio em altas concentrações de amônia, utilizando um sistema constituído por três reatores de biodiscos independentes utilizando três diferentes tipos de material suporte na confecção dos discos: cloreto de polivinila (PVC), poliestireno (PS) e poliuretano (PU). A biomassa removida do reator PU apresentou a mais alta velocidade específica de remoção de nitrogênio sob condições limitantes de oxigênio, assim como, foi a única que apresentou remoção anaeróbia. O reator PU apresentou uma camada de biofilme mais homogênea, maior adesão dos microrganismos e maior remoção de nitrogênio.

Partículas de zeólito, capazes de remover íons amônio de águas residuárias, foram eficazes em promover a formação de grânulos de bactérias Anammox, como

demonstrado por FÉRNANDEZ *et al.* (2008). Alternativamente, altas concentrações salinas foram utilizadas para estimular a agregação da biomassa.

A **Tabela 3-3** apresenta um resumo dos diferentes tipos de material suporte utilizados para o cultivo de bactérias Anammox relacionando a constituição, configuração e eficiência dos reatores.

**Tabela 3-3:** Comparação entre os diferentes tipos de material suporte utilizados para cultivo de bactérias Anammox quanto à constituição, configuração e eficiência do reator.

Material Suporte	Constituição	Reator	Eficiência* na remoção do Nitrogênio	Referência
Esponja de polietileno	Polietileno	Colunar de Fluxo Ascendente	85%	ZHANG <i>et al.</i> (2010)
Biofix	Fibras acrílicas	Colunar de Fluxo Ascendente	81,6%	QIAO <i>e at.</i> , (2009)
Esferas de gel de polivinil álcool/alginato	Complexo PVA/solução e alginato de sódio	Tanque Agitado	91%	QUAN <i>e at.</i> (2011)
Espuma de poliuretano	Poliuretano	Reator de Biodiscos Rotativos	50%, (3340 mg N.m <sup>-2</sup> .d <sup>-1</sup> )	PHILIPS. (2008)
Precipitado salino	NaCl	Batelada Sequencial	?	FÉRNANDEZ <i>et al.</i> (2008)
Partículas de zeólito	Clinoptilólito 96% puro	Batelada Sequencial	?	FÉRNANDEZ <i>et al.</i> (2008)
Nonwoven fabric	Poliéster	Cilindrico com fluxo contínuo	?	DATE <i>et al.</i> (2009)
Nonwoven fabric	?	Leito fixo em fluxo ascendente	26.0Kg-Nm <sup>3</sup> dia <sup>-1</sup> ( 247dias)	TSUSHIMA <i>et al.</i> (2007)

\* Maior valor obtido durante o processo.

Tsushima *et al.* (2007) e Date *et al.* (2009) obtiveram bons resultados no cultivo de Anammox ao utilizar *nonwoven fabric* como suporte para a formação de biofilme. O material é normalmente constituído por fibras de poliéster que se arranjam formando uma malha, como as fibras de um tecido natural.

Várias opções de material suporte estão sendo testadas e disponibilizadas para a otimização dos processos de tratamento de efluentes, sua escolha deve considerar as características físico-químicas do efluente utilizado, comunidade microbiana de interesse a ser imobilizada e configuração do reator, associado aos custos que cada um gera no processo.

### **3.6 - Métodos moleculares para detecção e quantificação de microrganismos**

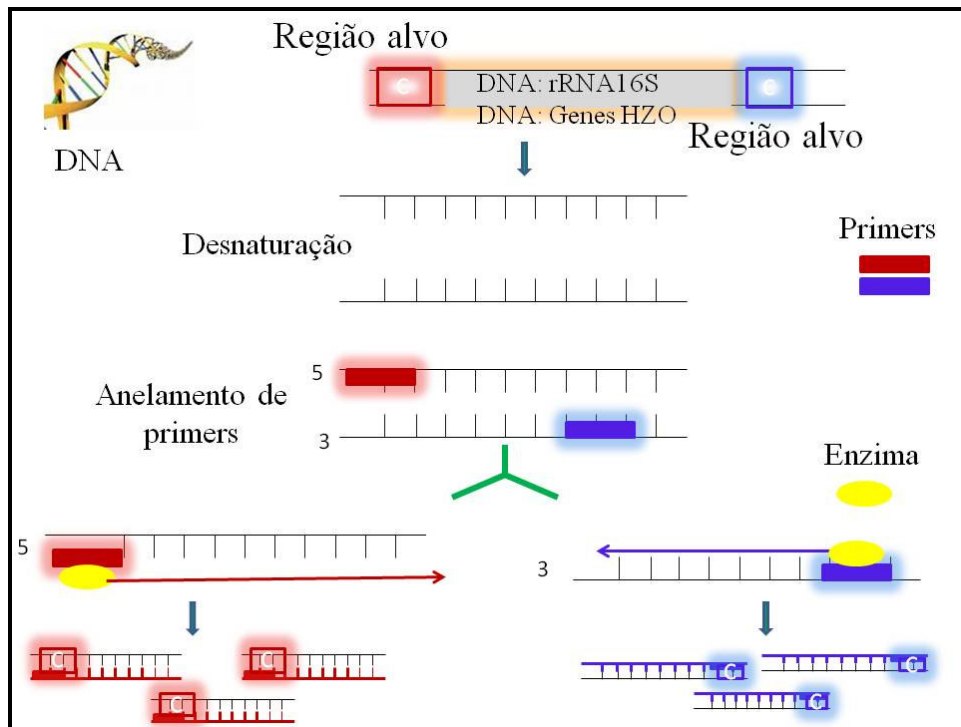
Como as Anammox não foram isoladas em técnicas convencionais de cultivo em microbiologia, seus estudos dependem das técnicas moleculares para o desenvolvimento das pesquisas dessas bactérias (SCHMID *et al.*, 2005).

#### **3.6.1 - Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

Um grande avanço nos estudos de diversidade microbiana veio com o advento de técnicas moleculares, baseadas na análise do DNA de microrganismos retirado diretamente dos ambientes naturais, sem a necessidade de multiplicação prévia das células. Os métodos moleculares tem sido decisivos em vários estudos de microbiologia ambiental e têm como etapa básica, em sua maioria, a técnica conhecida como Reação em Cadeia da Polimerase- PCR (**Figura 3.5**).

Essa técnica envolve a coleta de amostras (organismos, solo, água, lodo, sedimento, secreções, etc.) seguida pela extração dos ácidos nucleicos. A PCR permite sintetizar pequenos fragmentos do DNA específicos de uma célula, permitindo a amplificação, *in vitro*, de várias cópias de determinadas regiões desse DNA. A reação de PCR é específica e permite a amplificação de sequências do DNA alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de sequências. A reação se caracteriza basicamente

pela extensão do fragmento de DNA a partir dos *primers*, pela ação da enzima DNA polimerase, a *Taq* polimerase.



**Figura 3.5.-** Desenho esquemático da reação em cadeia da polimerase- PCR

Essa técnica envolve a coleta de amostras (organismos, solo, água, lodo, sedimento, secreções, etc.) seguida pela extração dos ácidos nucleicos. A PCR permite sintetizar pequenos fragmentos do DNA específicos de uma célula, permitindo a amplificação, *in vitro*, de várias cópias de determinadas regiões desse DNA. A reação de PCR é específica e permite a amplificação de sequências do DNA alvo mesmo em uma amostra com grande diversidade de sequências. A reação se caracteriza basicamente pela extensão do fragmento de DNA a partir dos *primers*, pela ação da enzima DNA polimerase, a *Taq* polimerase. Inicialmente o DNA é desnaturado, seguido pelo anelamento dos *primers* e extensão do fragmento. Esse ciclo de desnaturação-anelamento-extensão ocorre várias vezes, permitindo a amplificação exponencial da sequência alvo (SAIKI *et al.*, 1985). A obtenção desse fragmento via PCR permite a realização de várias outras técnicas como a clonagem e sequenciamento, utilizadas

nesse trabalho.

### 3.6.2 - Clonagem

Na clonagem esses fragmentos de DNA amplificados são inseridos em um vetor que pode ser o plasmídeo, (ou vírus ou levedura) que utilizamos para transformar células competentes (geralmente células de *Escherichia coli*).

A bactéria “transformada” é cultivada para gerar cópias do plasmídeo com o gene clonado. Em seguida, isola-se o DNA plasmidial o qual pode ser sequenciado.

O conjunto de todos os clones formam uma “biblioteca de genes”, que representa a comunidade bacteriana da amostra analisada. As sequências obtidas são comparadas às sequências depositadas numa base de dados conhecida (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*) / e analisadas pela ferramenta do *Basic Local Alignment Search Tool*- BLAST.

O sucesso da identificação de organismos pela técnica de PCR depende da escolha dos *primers*. Para isso é necessário saber qual parte do DNA se deseja amplificar ou qual o objetivo de se utilizar a técnica, utilizando um bom biomarcador.

Biomarcadores, são moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e regiões variáveis, específicas para grupos ou indivíduos. Um biomarcador comumente utilizado é a molécula de RNA ribossomal, (RNAr). Esta molécula é parte integrante do ribossomo, estrutura celular responsável pela síntese de proteínas que está presente em todas as células, isso a faz ser considerado um biomarcador eficaz. (MADIGAN 2010).

Porém o RNA é uma molécula instável e pode ser facilmente degradada ao ser manipulada. Por isso, geralmente, é substituída pela sequência do DNA que codifica a região 16S do RNAr. O DNA é uma molécula mais estável e fácil de manipular comparado ao RNA. Portanto, a amplificação e análise da porção do gene RNAr16S, têm sido utilizada para pesquisar a biodiversidade e a estrutura da comunidade microbiana de diversos ambientes (VIANCELLI, 2009).

Entretanto, tem sido observado que essa natureza conservada do 16S rRNA pode limitar a eficiência em detectar/definir a diversidade das bactérias Anammox e sua distribuição nos diferentes ambientes; por permitir a amplificação dos genes pertencentes aos *Planctomyces* e não especificamente das bactérias Anammox (LI *et al.* 2010).

No entanto, há a opção de se trabalhar com outros genes além dos presentes no RNAr16S, como por exemplo, genes que codificam enzimas específicas. Estes genes são fragmentos de DNA de um grupo de microrganismo que não devem ser encontrados nos demais. Por exemplo, o gene que codifica uma enzima específica das bactérias Anammox, e está ausente nas outras bactérias. Avanços na genômica das Anammox têm demonstrado, por exemplo, que o gene da hidrazina sintase (HzsA) (HARHANGI *et al.*, 2012) e hidrazina oxidoreductase (*hzo*) (HIRSCH *et al.*, 2010), têm sido considerados biomarcadores eficazes na detecção das bactérias Anammox.

### ***3.6.3 - Sequenciamento de nova geração -NGS***

Tradicionalmente, a diversidade das comunidades microbianas é avaliada por técnicas de cultivo ou de microscopia óptica. Embora muito útil para a realização de estudos taxonômicos, fisiológicas e genéticos, as técnicas baseadas na cultura são insuficientes para uma caracterização precisa da diversidade funcional e filogenética das comunidades microbianas. Isso porque apenas uma pequena fração da diversidade microbiana da natureza pode ser recuperado no laboratório (GAO *et al.*, 2011). Na última década, técnicas independentes de cultivo molecular têm permitido o acesso aos microrganismos ainda não cultivados, fornecendo dados significativos sobre as comunidades bacterianas em processos de tratamento de águas residuárias (SILVA *et al.*, 2012).

Estudos de ecologia microbiana baseados em bibliotecas de genes 16S rRNA geralmente têm mostrado uma diversidade bacteriana subestimada. A aplicação de



tecnologias de sequenciamento de última geração permitiu a obtenção de um grande número de sequências, suficientes para revelar a complexidade de uma comunidade microbiana ambiental.

O primeiro método popular de sequenciamento da DNA foi o de terminação de cadeia de Sanger, publicado em 1977. No entanto, os estudos moleculares de comunidades microbianas utilizando sequenciamento Sanger foram limitados pelo número de sequências que podem ser obtidas (ZHANG *et al.*, 2010). Em 1986 foi lançado o primeiro sequenciador automático de DNA, o ABI 370, e em 1998, o primeiro sequenciador de eletroforese capilar, o ABI 3700

O sequenciamento de nova geração – Next Generation Sequencing, em inglês- NGS – são processos de sequenciamento de DNA que utilizam metodologias diferentes das de Sanger, objetivando acelerar e reduzir o custo do processo de sequenciamento. Apesar de diferentes, todos os sequenciadores de NGS se baseiam no processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA. Porém, enquanto um sequenciador de eletroforese processa, no máximo, 96 fragmentos por vez, os sequenciadores de nova geração sequenciam bilhões de fragmentos ao mesmo tempo.

#### *Ion Torrent*

A maioria dos sequenciadores utiliza uma DNA polimerase para gerar a fita complementar ao DNA molde, bases marcadas por fluoróforos, e câmeras para a detecção. O Ion Torrent é diferente pois a detecção é feita diretamente. A reação de polimerização gera naturalmente um próton, que altera o pH do meio. Essa alteração do pH é detectada por um transistor e convertida em um sinal elétrico.

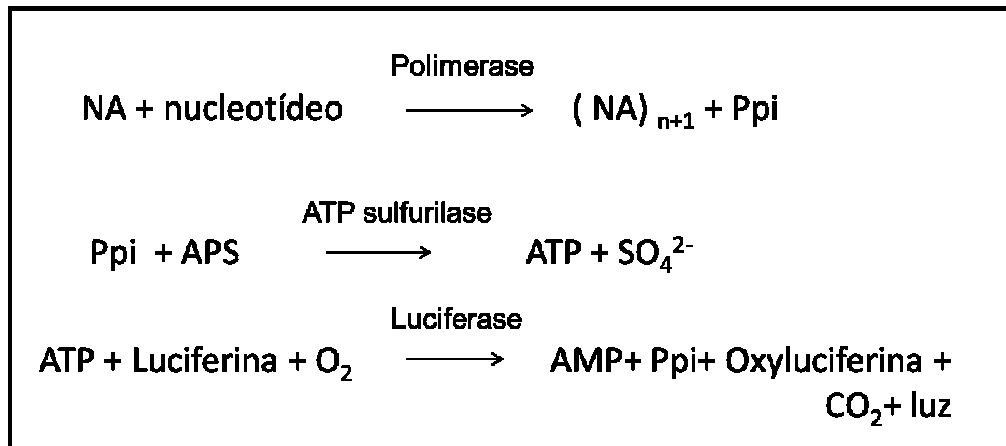
## SOLID

O SOLID - Sequencing by Ligation and Detection ao invés de utilizar uma polimerase e detectar a incorporação de cada uma das bases, ele utiliza octâmeros marcados com fluoróforos para identificar a sequência alvo. As primeiras 5 bases da sonda garantem a especificidade da ligação dessa com o DNA molde, enquanto que as 3 últimas são inosinas que anelam de maneira inespecífica. Conectado à última, inosina temos o fluoróforo que gerará o sinal luminoso a ser detectado pelo sequenciador.

No SOLiD, assim como no Ion Torrent, cada fragmento é amplificado milhares de vezes na superfície de uma esfera- *bead*. Essas *beads* são depositadas e fixadas em uma lâmina de vidro. A reação de sequenciamento ocorre para cada um dos milhares de clones em cada uma das centenas de milhões de *beads* depositadas na lâmina.

### *Pirosequenciamento 454*

O pirosequenciamento 454 foi a técnica utilizada nesse trabalho. O sistema 454 foi a primeira plataforma de sequenciamento de nova geração a ser comercializada, ela realiza o sequenciamento baseado em síntese. A leitura da sequência nesse sistema é realizada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, oriundo da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, o pirofosfato é convertido a ATP, pela ATP sulfúrilase, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz capturado por uma câmera (CCD -charge-coupled device) acoplada ao sistema (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6-** Desenho esquemático das reações que ocorrem no pirosequenciamento

O sistema requer que o DNA seja fragmentado em sequências de 300 – 800pb, transformado em fragmentos fosforilados e ligados a adaptadores de sequência específica. A biblioteca de DNA da amostra é ligada a adaptadores A e B nas extremidades 3' e 5' dos fragmentos, respectivamente, os quais são utilizados nas etapas posteriores de isolamento dos fragmentos (A-B), amplificação e nas reações de sequenciamento.

O adaptador B possui biotina ligada à extremidade 5', o que permite o isolamento dos fragmentos ligados ao adaptador A na extremidade 3' e adaptador B na extremidade 5' na amostra. Somente os fragmentos A - B são eluídos na reação de purificação e são especificamente ligados às microesferas que estão com várias cópias da sequência complementar exata ao adaptador B de um único fragmento (MARGULIES *et al.*, 2005 apud CARVALHO & SILVA., 2010). O outro adaptador é utilizado no anelamento do *primer* que inicia a reação de sequenciamento. As microesferas ligadas aos fragmentos únicos de fita simples são então emulsionadas em uma mistura de água e óleo com reagentes da PCR para amplificação clonal do fragmento de fita simples em cerca de 1 milhão de cópias.

Na PCR em emulsão, o óleo em solução aquosa forma micelas, nas quais as microesferas são capturadas. Cada micela funcionará como um microrreator, produzindo muitas cópias idênticas de um mesmo fragmento isoladamente em um micros suportes . Após a PCR de emulsão, as microesferas ligadas aos fragmentos de fita simples são depositadas em poços distintos em uma placa de sílica onde os reagentes para o sequenciamento são distribuídos. As reações de sequenciamento ocorrem em cada poço, para um único tipo de fragmento ligado à microesfera, não havendo, portanto, competição por reagentes com outros fragmentos da biblioteca.

A placa de sequenciamento é dividida em 1,6 milhões de poços com diâmetro suficiente para alojar uma única microesfera. A placa de sequenciamento é inserida junto ao sistema óptico de leitura no equipamento. Os reagentes e as soluções de sequenciamento são então distribuídos por toda a placa a cada ciclo para obtenção do sequenciamento paralelo dos 1,6 milhões de poços. O sequenciamento é realizado em ciclos, e a cada ciclo um tipo determinado de nucleotídeo é adicionado à reação. Se o nucleotídeo adicionado for incorporado à sequência em síntese, um sinal de luz é emitido, sendo a intensidade desse sinal um reflexo do número de nucleotídeos de um tipo específico que foram sucessivamente incorporados na molécula. Como o nucleotídeo que é adicionado a cada ciclo é conhecido, o sinal de luz emitido pode ser diretamente utilizado como informação de sequência. A **Tabela 3.4** apresntnat um resumo das principais características do SNG.

**Tabela 3.4-** Tabela comparativa de tecnologias de sequenciamento de nova geração (dados fornecidos pelos fabricantes a Okada., 2013)

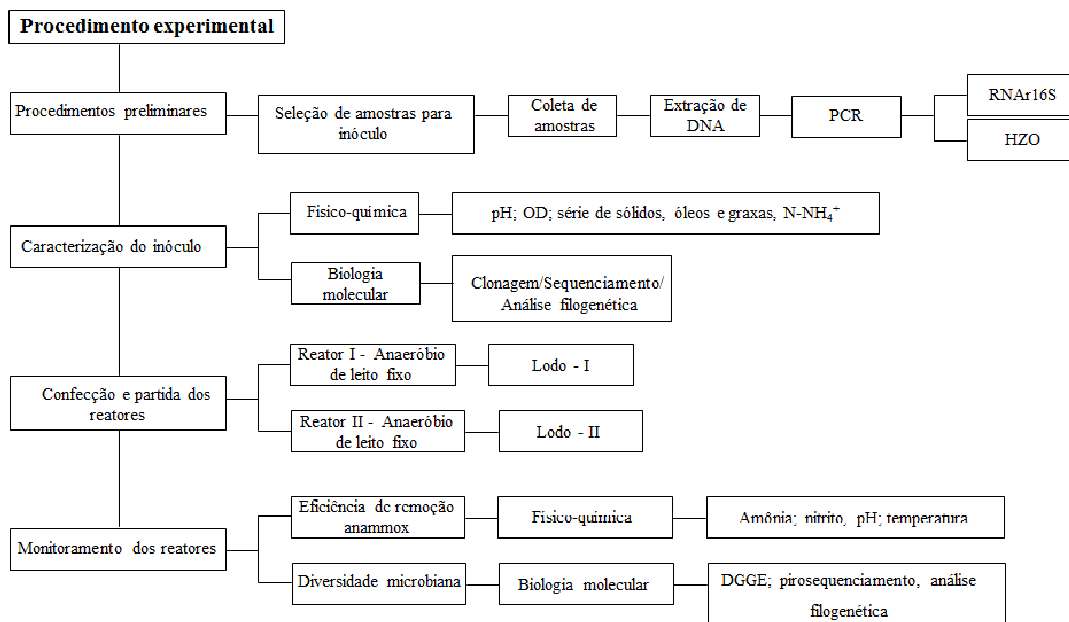
	454 GS-FLX Plus	Illumina HiSeq 2000	SOLiD v4	Ion torrent – 318 Chip
<i>Throughput</i>	600 Mb	270-300 Gb	40 Gb	2 Gb
Comprimento das leituras (pb)	500-600	2 x 100	2 x 50	200-400
Leituras por corrida	> 1 milhão	3 bilhões	700 milhões	10 milhões
Tempo de corrida	10 horas	11 dias	7 dias	2 horas

## CAPÍTULO 4

### METODOLOGIA

#### 4.1 – Fluxograma experimental

O desenvolvimento experimental deste trabalho foi dividido em quatro etapas. A **Figura 4.1** apresenta o fluxograma com a sequência metodológica prevista para alcançar o objetivo final do trabalho, correlacionando cada etapa com a sequência das atividades experimentais propostas.



**Figura 4.1** – Fluxograma experimental.

#### 4.2 – Seleção dos inóculos

Para a obtenção de lodos que pudessem ser utilizados como inóculos desses reatores, foram pesquisados sedimentos de diferentes sistemas de tratamentos de esgoto doméstico e industrial.

Todas as coletas exploratórias (de 23 amostras) foram realizadas no período de janeiro a junho de 2011 para as análises de biologia molecular e caracterização físico-química. As

amostras foram coletadas em frascos de polietileno, os quais foram acondicionados em caixas de isopor com gelo, devidamente lacradas, identificadas e, posteriormente, levadas ao laboratório.

#### **4.2.1 – Origem das amostras do inóculo**

Foram pesquisados sedimentos de diferentes sistemas de tratamentos de esgoto sanitário situados no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento - CePTS da UFMG, situado junto à Estação de Tratamento de Esgoto da Companhia de Saneamento de Minas Gerais – COPASA. Tal local foi escolhido, principalmente, devido aos resultados positivos de trabalhos prévios que detectaram a presença de bactérias Anammox em amostras de lodos do CePTS (Araújo *et al.*, 2010).

O lodo da ETE industrial foi coletado na Refinaria de Petróleo Gabriel Passos – REGAP- unidade da Petrobrás. Esse ambiente foi escolhido para teste em decorrência de trabalho prévio realizado por profissionais do DESA junto à REGAP, promovendo uma abertura para parceria na realização de projetos de pesquisa. A escolha da REGAP se deu, principalmente, pela demanda em responder se as bactérias Anammox poderiam estar presentes em um ambiente com presença de compostos tóxicos como os sulfetos e compostos aromáticos como fenóis. Além de considerarmos importante comparar a eficiência do processo Anammox desenvolvido a partir de um lodo obtido em ETE de esgoto doméstico com lodo proveniente de ETE industrial.

Portanto, seria promissor detectar a presença de bactérias Anammox visando a utilização desse lodo como inóculo de um dos reatores previstos nesse trabalho.

#### **4.2.2 - Descrição das unidades de tratamento CePTS e REGAP**

##### 4.2.2.1 - CePTS

O CePTS dispõe de diferentes sistemas de tratamento de esgoto em escala de demonstração, com equivalentes populacionais de até 500 habitantes. Recebe uma alíquota do esgoto bruto que chega a ETE Arrudas, após ter sido submetido ao tratamento preliminar, constituído de gradeamento mecanizado e desarenador. Esse esgoto é transportado por um canal que o conduz para as unidades de tratamento subsequentes da ETE. Nesse ponto, parte do esgoto é direcionado por um sistema moto bomba para as unidade de tratamento do CePTS.

Vários processos e configurações de unidades para tratamento de esgotos são estudados no CePTS, destacando-se Upflow anaerobic Sludge blanket- UASB-, filtros biológicos percoladores, lagoas de polimento, leito submerso (*wetland* construído) de fluxo horizontal e leito plantado de fluxo vertical. Dentre esses, foram escolhidos para pesquisa exploratória objetivando detectar Anammox : três lagoas de polimento em série, quatro reatores UASB, uma *wetland* construída com leito plantado com *Typha latifolia* e outra não plantada. A **Figura.4.2** mostra a foto de satélite do CePTS com destaque para os sistemas escolhidos para a pesquisa exploratória objetivando detectar a presença das bactérias Anammox.



**Figura 4.2** - Foto de satélite do CePTS com destaque para os sistemas escolhidos: Lagoas de Polimento (5, 6, e 7), *Wetlands* construídas (8 e 9) Reatores UASB 10, 11, 12, 13.

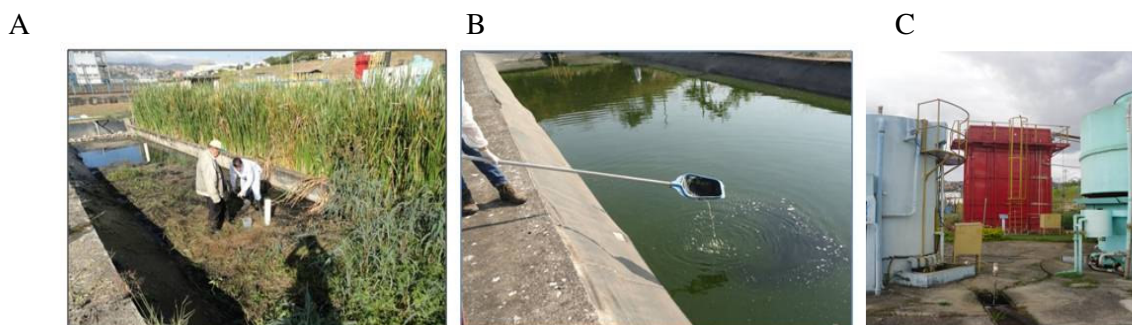
- **Lagoas de polimento**

As lagoas de polimento representadas pelos números 5, 6 e 7 na **Figura 4.2**, foram construídas em série, e projetadas para realizar o pós tratamento do efluente do reator anaeróbio tipo UASB. O esgoto utilizado para alimentar esse sistema é captado após o tratamento preliminar da ETE Arrudas, segue para o reator UASB Ferrocimento representado pelo número 12 na **Figura 4.2**. O efluente do UASB ferrocimento é tratado na lagoa 5 que segue em série para as lagoas 6 e 7 sucessivamente. Após passar por um filtro grosseiro disposto no fim da lagoa 7, o efluente tratado é encaminhado para o tratamento secundário da COPASA. A **Tabela 4.1** apresenta algumas características das lagoas de polimento.

**Tabela 4.1-** Características das lagoas de polimento

	Lagoas 5 e 6	Lagoa 7
Volume	125 m <sup>3</sup>	42 m <sup>3</sup>
Comprimento fundo	25,00 m	16,56 m
Largura no fundo	5,25 m	5,25 m
Profundidade média	0,75 m	0,50 m
TDH	4,3d	1,5 d

A coleta do sedimento dessas lagoas para análises moleculares foi realizada a 7 (A) e 10 (B) metros (extensão) da entrada do afluente, numa profundidade de 50 cm aproximadamente por meio de um amostrador tipo rede (coleta de plâncton), **Figura 4.3 B**. O volume coletado para análises de PCR foi de 500 mL. As amostras foram transportadas no gelo, em frascos de polietileno, previamente lavados com solução de Extran 1%, e enxaguados e esterilizados por meio de autoclave.



**Figura 4.3-** Coleta de amostras no CePTS: A) *Wetland* construída não plantada, (B) Lagoa de polimento e (C) Reatores USAB.

- **Wetlands**

As unidades de leito submerso, *Wetland* construída, **Figura 4.3 A** foram construídas em paralelo, uma com leito plantado com *Typha latifolia* e outra não plantada. O fluxo hidráulico é contínuo, horizontal e subsuperficial no *wetland*. Em cada unidade, o esgoto era pré-tratado no reator UASB Vermelho. O percurso do esgoto através da unidade de tratamento possibilita a remoção complementar da matéria orgânica e nutriente. Os leitos de ambas unidades são de escória siderúrgica.

As *wetlands* construídas plantadas e não plantadas possuem aproximadamente 24,10 m de comprimento e 3 m de largura.



As coletas foram realizadas no tubos de PVC dispostos ao longo dos *wetlands* não plantado ( amostras 8A, 8B, 8C) e plantado (amostras 9A, 9B, 9C); numa a distância de 6 ,12, 18m em relação a entrada do efluente e numa profundidade de 40, 45 e 50 cm de profundidade respectivamente mostrados nas **Figura 4.2 e Figura 4.3** . O volume coletado de cada ponto foi de 500 mL.

- **Reatores UASB**

Os reatores UASB realizam o processo de tratamento anaeróbio onde o esgoto é distribuído no fundo do tanque e sai do reator através de um decantador interno, localizado na parte superior da unidade. O percurso do esgoto em fluxo ascendente, através do leito e da manta de lodo, possibilita a estabilização da matéria orgânica, a formação de novas células e de biogás. Um dispositivo trifásico de separação de sólidos, líquidos e gases se localiza na parte superior do reator e garante a liberação do gás contido na mistura líquida, propiciando condições ótimas de sedimentação do lodo no compartimento de decantação e o seu retorno ao compartimento de digestão.

Cada reator UASB do CePTS possui quatro a cinco pontos de amostragem de lodo ao longo da altura do compartimento de digestão.

A amostragem de lodo dos reatores UASB foi realizada de forma a se obter amostra composta. Foram coletados 500 mL de cada altura do reator. Como as dimensões de cada reator variam, também variaram o número desses pontos de coleta e conseqüentemente o volume amostrado. A **Tabela 4.2** apresenta as dimensões e número de pontos de coleta de cada reator UASB. O preparo dos frascos foram os mesmos descritos para a coleta das lagoas de polimento variando apenas o volume do frasco que passou a ser de 5L. Os pontos de coleta podem ser visualizados na **Figura 4.3 C**. As principais características dos reatores UASB estão detalhadas na **Tabela 4.2** .

A descrição técnica de cada sistema foi retirada do livro explicativo produzido pelo Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais ([http://issuu.com/severidade/docs/livreto\\_cepts](http://issuu.com/severidade/docs/livreto_cepts)).

**Tabela 4.2 - Características dos reatores UASB**

<b>Características dos UASB</b>	<b>UASB Ferrocimento (2)</b>	<b>UASB Vermelho (4)</b>	<b>UASB Verde (1)</b>	<b>UASB Rotogine (3)</b>
Volume útil (m <sup>3</sup> )	14,20	13,8 a 16,8	22,0	16,8
Altura útil (m)	4,50	4,5 a 5,5	4,50	4,80
Diâmetro interno (m)	2	-	2,50	-
Área útil/ Superficial*(m <sup>2</sup> )	-	3,10	4,90	3,50
Vazão Média (m <sup>3</sup> /d)	40	37 a 81	80	48
TDH horas	7,5	5 a 9	7	8,5
Material	Ferrocimento	Aço carbono	Fibra de vidro	Aço carbono
Especificidade	-	Germinados	Cilindrico 3 câmaras	-
Pontos de coleta (alturas)	6	7	5	6
Volume coletado Litros	3	3,5x 2	2,5 x 3	3

#### 4.2.2-2- REGAP

A Petrobrás é uma sociedade anônima de capital aberto, cujo acionista majoritário é o Governo Brasileiro, e atua como uma empresa de energia nos setores de exploração, produção, refino, comercialização e transporte de óleo e gás natural, petroquímica, distribuição de derivados, biocombustíveis e outras fontes renováveis de energia. Está presente em 28 países.

A Refinaria de Petróleo Gabriel Passos – REGAP- unidade da Petrobras, inaugurada em 1968, está localizada na divisa dos municípios de Betim e Ibité, área metropolitana de Belo Horizonte. Seus principais produtos são: gasolina, óleo diesel, querosene de aviação, GLP, aguarrás, asfaltos, coque e enxofre.

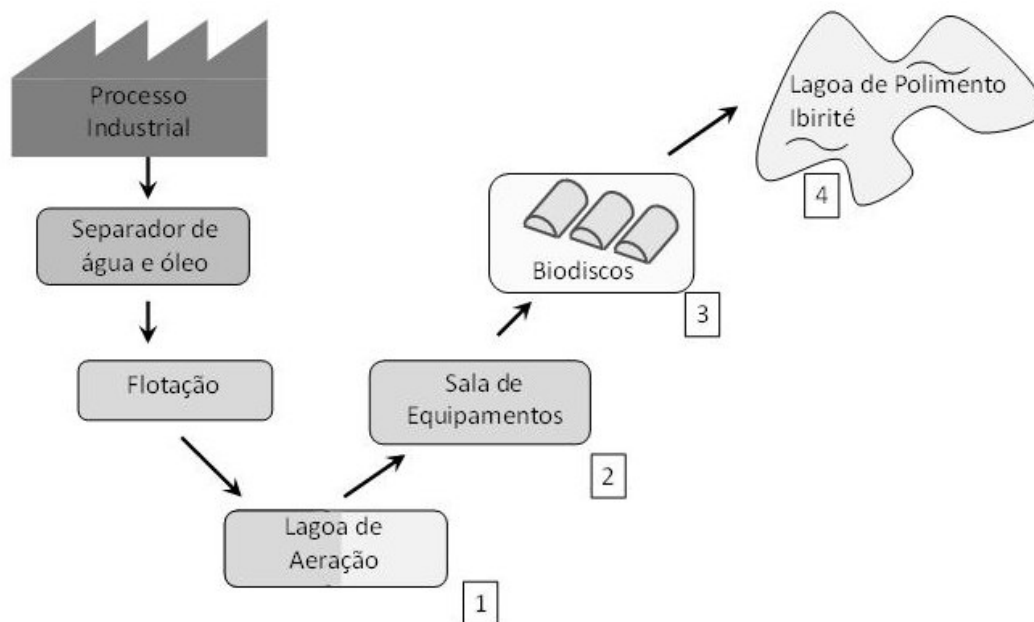
Os efluentes dos processos são geralmente definidos como qualquer água ou vapor condensado que tenha entrado em contato com óleo, estando este último sob a forma líquida ou gasosa, e que pode, portanto, conter óleo ou outros contaminantes químicos. Incluem soluções ácidas, soda caustica, águas de lavagem do petróleo cru e dos derivados, a água proveniente da etapa de dessalinização, os condensados resultantes da retificação a vapor e da destilação, assim como da limpeza ou regeneração com vapor dos catalisadores de processo, as águas de chuva contaminadas, dependendo da região da refinaria de onde forem drenadas.

O Sistema Petrobras descartou, em 2009, 197,2 milhões de m<sup>3</sup> de efluentes hídricos, incluindo

o esgoto sanitário de suas unidades administrativas e a água produzida no processo de extração de petróleo. A carga de óleos e graxas nos efluentes foi de 1.634 toneladas, a carga de demanda química de oxigênio (DQO) lançada foi de 5.191 toneladas, a de amônia, 960 toneladas. ( <http://www.petrobras.com.br/rs2009>).

A REGAP, atualmente, realiza a remoção de nitrogênio amoniacal por nitrificação em sistemas de biomassa em suspensão pelo processo de lodo ativado e testa o sistema de nitrificação em biodisco numa unidade piloto.

A **Figura 4.4** apresenta o desenho esquemático do sistema de tratamento de efluentes líquidos da REGAP.

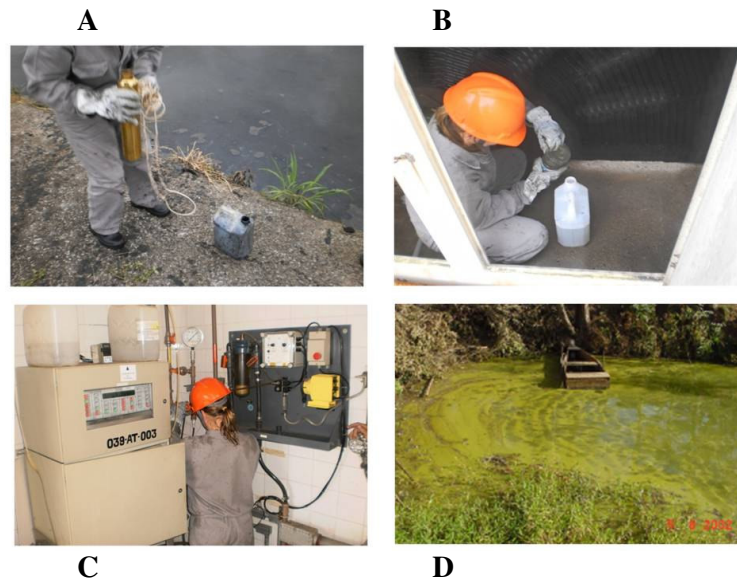


**Figura 4.4** - Desenho esquemático do sistema de tratamento de efluentes líquidos da REGAP.

Seus efluentes líquidos industriais são coletados em três redes distintas: águas contaminadas, águas oleosas e águas da unidade de coque. Estas correntes se unem à montante da estação de tratamento de despejos industriais. Essa estação é constituída de quatro separadores de água e óleo, uma unidade de flotação, duas bacias de acumulação de águas de chuvas ou excedentes das redes de água oleosa e de água contaminada que consistem no tratamento primário. O tratamento secundário é constituído de duas lagoas de aeração, sendo uma Bacia Aerada Sul de mistura completa -BAS-Sul e a outra Bacia Aerada Norte facultativa -BAN (REGINATTO *et al.* 2005, SANTIAGO *et al.* 2011). No momento da coleta, essa lagoa aerada Norte, no

momento da coleta, estava funcionando como zona de decantação e se encontrava com grande acúmulo de lodo devido ao extenso período sem remoção do mesmo. O efluente dessas lagoas é encaminhado para o sistema de biodiscos e em seguida para lagoa de polimento “Lagoa de Ibirité”. Posteriormente é lançado no corpo receptor, Córrego Pintados.

A **Figura 4.5** apresenta as fotos tiradas dos locais definidos para coleta: Bacia de “Aeração Norte”, Sistema de Biodiscos, Lagoa de Polimento de Ibirité e Sala de distribuição (Bombas).



**Figura 4.5-** Fotos dos pontos de coleta realizada na REGAP.(A) Lagoa “Aerada” Norte, (B) Sistema de Biodiscos, (C) Sala de bombas, (D) Lagoa de Ibirité.

A **Tabela 4.3** apresenta todos os pontos de coleta de lodo do CePTS e REGAP .

**Tabela 4.3:** Pontos de amostragem de lodo do CePTS e REGAP

<b>Ponto de amostragem</b>	<b>Local</b>
Lagoa de Polimento 1A*	CePTS
Lagoa de Polimento 1B*	CePTS
Lagoa de Polimento 2 <sup>a</sup> *	CePTS
Lagoa de Polimento 2B*	CePTS
Lagoa de Polimento 3 <sup>a</sup> *	CePTS
Lagoa de Polimento 3B*	CePTS
<i>Wetland</i> não plantado 40 cm**	CePTS
<i>Wetland</i> não plantado 45 cm**	CePTS
<i>Wetland</i> não plantado 50 cm**	CePTS
<i>Wetland</i> Plantado 40 cm**	CePTS
<i>Wetland</i> Plantado 45 cm**	CePTS
<i>Wetland</i> Plantado 50 cm**	CePTS
UASB – 1A***	CePTS
UASB – 1B***	CePTS
UASB – 1C***	CePTS
UASB – 2****	CePTS
UASB – 3****	CePTS
UASB – 4A****	CePTS
UASB – 4B****	CePTS
Lagoa Aerada Norte	REGAP
Biodiscos	REGAP
Lagoa de Ibirité	REGAP
Bombas de distribuição	REGAP

\* A e B: 7 e 10 metros de distância em relação ao ponto de entrada do afluente, respectivamente.

\*\* 40-45-50 :Diferentes profundidades (cm) amostradas nas *wetlands*.

\*\*\* A, B e C: Câmaras A,B e C do reator UASB 1, respectivamente.

\*\*\*\* A e B: Câmaras A e B do reator UASB 4, respectivamente.

### 4.3 - Processamento das amostras

O processamento das amostras consistiu em distribuir as diferentes amostras do lodo em frascos estéreis, centrifugar por 20 min a 4000rpm. O sobrenadante foi descartado, a biomassa sedimentada foi parte armazenada em papel alumínio e estocadas em freezer a -80°C, parte colocada em tubos de 2mL, apropriados para os equipamentos utilizados na extração de DNA.

#### 4.4 - Extração de DNA

A extração de DNA genômico dos organismos presentes nos lodos foi realizada com o kit comercial Power Soil DNA Kit, Mo Bio laboratórios, Inc., Carlsbad, CA, EUA, seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.5 - Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Com o objetivo de detectar as bactérias Anammox, o DNA extraído a partir das amostras dos lodos coletados foi amplificado por PCR. Foram utilizados pares de *primers* específicos para parte do gene que codifica o RNAr 16S de Anammox e Planctomicetos e um par de *primer*, que codifica o gene da enzima hidrazina oxidoreductase. Para as análises de amostras coletadas dos reatores após enriquecimento foi utilizado o par de *primers* da enzima hidrazina sintase-HzsA . Os *primers*, bem como as respectivas especificidades e sequências encontram-se descritos na **Tabela 4.4**.

**Tabela 4.4** –*Primers* utilizados para a detecção de bactérias Anammox

<i>Primers</i>	Especificidade	Sequência 5'→3'	Referência
Pla46f	RNAr16S de Planctomicetos	“GGATTAGGCATGCAAGTC”	NEEF <i>et al.</i> (1998)
Amx667r	RNAr16S organismos Anammox –	“ACCAGAAGTTCCACTCTC”	VAN DER START <i>et al.</i> ( 2007)
Am820r	RNAr16S dos Gêneros “ <i>Ca. Brocadia</i> ” “ <i>Ca. Kuenenia</i> ” –	“AAAACCCCTCTACTTAGTCCC”	SCHMID <i>et al.</i> (2003)
Amx1240r	RNAr16S de “ <i>Ca. Brocadia Anammoxidans</i> ”	“TTTAGCATCCCTTTGTACCAACC	SCHMID <i>et al.</i> (2003)
<i>HzoF1</i>	Hydrazina oxidoreductase ( <i>hzo</i> )- gene das Anammox	“TGTGCATGGTCAATTGAAAG”	QUAN <i>et al.</i> (2008)
Ana <i>hzo2R</i>	Hydrazina oxidoreductase ( <i>hzo</i> ) gene das Anammox	“ACCTCTTCWGCAGGTGCAT”	QUAN <i>et al.</i> (2008)
HzsA526f	Gene da hidrazina sintase de bactérias Anammox	TAYTTTGAAGGDGACTGG	HARHANGI <i>et al.</i> (2012)
HzsA18557r	Gene da hidrazina sintase de bactérias Anammox	AAABGGYGAATCATARTGGC	HARHANGI <i>et al.</i> (2012)

A reação da PCR continha 5µL de tampão IVB 10x (Phoneutria), 0,2 µL de dNTPs (*Fermentas*) a 10mM e 0,25 µL de cada *primer* a 30pmol e 1µL da enzima taq polimerase

(Phoneutria) a 5U e o volume final de 25 µL era completado com água para PCR, dependendo do volume de DNA utilizado como molde.

As condições de amplificação na PCR para os pares de *primers*: Pla46F-Amx667R, Pla46F-Amx820R, Pla46F-Amx1240R, 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, 1 minuto de extensão à 72°C, e a extensão final de 7 minutos à 72°C.

Para os *primers HzoF1/ Ana hzo2R* a condição utilizada foi de 94°C por 5 min de desnaturação, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, anelamento 55°C por 45s, extensão a 72 °C por 2 min, extensão final 95 °C por 30s e 10 min a 72 °C.

Para os *primers HzsA526f - HzsA1857r* as condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação a 96 °C por 1 minuto, trinta ciclos de desnaturação a 96 °C por 1 minuto, anelamento a 54 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos mais a extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Todas as amplificações foram realizadas no mínimo duas vezes, em dois eventos distintos de PCR. Em todos os eventos foram realizados os controles positivo e negativo das reações. A presença e tamanho dos produtos amplificados foram visualizados em eletroforese de gel de agarose 1%.

#### **4.6 - Eletroforese em gel de agarose**

Alíquotas de 5,0 µL de ácidos nucleicos: DNA genômico / produtos de PCR foram analisados mediante eletroforese horizontal, em géis de agarose 1%, a 75 V por 40 minutos; corados com brometo em etídio (1 µg/mL) por 10 min, parcialmente descorados em água destilada por 5 min. A observação do gel foi feita no transiluminador de luz UV (UVP Products) com a finalidade de confirmar o tamanho, quantidade e a pureza do DNA. As imagens dos géis foram registradas por um sistema de captura de imagem. Os marcadores de peso molecular utilizados foram: 100 bp DNA Ladder , GeneRuler™ Low Range DNA Ladder.

#### 4.7 - Clonagem, sequenciamento e análise filogenética das amostras selecionadas como inóculos dos reatores.

Para o estudo da diversidade bacteriana presente nos lodos inoculados foi utilizada a técnica de clonagem, seguida pelo sequenciamento e análises filogenéticas das sequências obtidas.

O DNA da amostra de lodo inoculado foi extraído utilizando o *Kit Power Soil DNA*, *Mo Bio laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA*, seguindo as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi medida em espectrofotômetro *Nanodrop*, Thermocientific. Os fragmentos de DNA isolados foram amplificados com *primers* específicos para a porção 16S do DNA ribossomal de bactérias Anammox (PLA46F/Amx820R), nas mesmas condições utilizadas em ARAÚJO *et al.*, 2010. Os produtos de PCR foram purificados (*Wizard SV gel clean-up system, Promega*) e clonados no vetor *pGem-T easy Vector* (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. e transformado em células de *Escherichia coli JM 109*. As colônias transformadas, de cor branca, contendo o gene *lacZ* interrompido pela presença do inserto, foram repicadas em caldo Luria Bertani (LB). A presença dos plasmídeos recombinantes foi confirmada por PCR de colônia utilizando par *primers* PLA46F/Amx820 e visualizadas em gel de agarose 1%. Após seleção das colônias positivas, foi feita nova extração de DNA (3mL de cultura), dosagem e visualização em gel de agarose 1% objetivando posterior envio para o sequenciamento do DNA.

Para estocagem dos clones, foram tomadas alíquotas de 700 µL da cultura em caldo LB, adicionados 300 µL de glicerol e armazenadas em freezer -80 °C. O sequenciamento dos clones foi realizado na Coreia, pela *Macrogen Inc.* O sequenciador de DNA utilizado foi o 3730XL. A existência de DNA quimera foi verificada pelo programa *Bellerophon*. As sequências obtidas foram analisadas quanto à qualidade e alinhamento através do programa *Phred* v.0.020425, *Phrap* v.0.990319 e *Consed* 12.0. Os agrupamentos das sequências em unidades taxonômicas operacionais (UTO) foram feitos através do programa DOTUR e a partir delas, foi estimada a cobertura (C) da biblioteca através do seguinte cálculo:

$$C = 1 - \text{número de UTOS únicas/número de sequências} \times 100$$

As sequências de DNA obtidas foram comparadas às sequências depositadas no banco de dados, *GenBank* utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool- BLAST*, para a pesquisa de sequências homólogas semelhantes as sequências obtidas na biblioteca de DNA



construída.

A relação filogenética entre as sequências foi estabelecida com a confecção das árvores filogenéticas utilizando o programa *MEGA.4* (Tamura, Dudley, Nei, Kumar 2007), pelo método *neighbor-joining*. As sequências foram enviadas para o Genbank e estão em fase de processamento.

#### 4.8 - Análises físico – químicas realizadas nas amostras selecionadas como inóculo dos reatores

Após a análise exploratória dos sistemas de tratamento de efluentes que definiu os lodos que seriam utilizados como inóculo, foi feita uma nova coleta de lodo, nos ambientes selecionados, para caracterização físico química dos mesmos, objetivando conhecer outros parâmetros físico-químicos dos inóculos. Toda a metodologia de análises físico-químicas utilizadas durante o experimento seguiram os protocolos definidos no *Standard Methods*, (APHA. 2012). A **Tabela 4.5** apresenta os parâmetros e métodos utilizados nas análises dos lodos selecionados como inóculo.

As análises das amostras selecionadas para o inóculo dos reatores I e II foram encaminhadas para o Laboratório de Físico Química do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da UFMG e para o laboratório particular *Limnos* Hidrobiologia e Limnologia LTDA, respectivamente.

**Tabela 4.5** - Relação dos métodos analíticos utilizados na análise do lodos selecionados para inóculo dos reatores

Parâmetro	DESA	Limnos
Nitrogênio Amoniacal	SM - 4500 – C	SM-4500 NH <sub>3</sub> BD
Óleos e Graxas Totais	-	SM-5520B
Oxigênio Dissolvido	*	SM-4500OC
pH a 25°C	*	SM-4500H <sup>+</sup> B
Sólidos Fixos Totais	SM - 2540 – E	SM-2540E
Sólidos Suspensos Totais	SM -2540 – D	SM-2540D
Sólidos Voláteis Totais	SM - 2540 – E	SM-2540E

SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21 th. Edition, APHA., 2012.

\*As Análises de pH, temperatura e oxigênio dissolvido da amostra coletada no CePTS foram realizadas *in locu* por medidor multiparâmetros ( HANNA).

#### 4.9 -Bioreatores e periféricos

Para o enriquecimento e cultivo de bactérias Anammox foram confeccionados dois reatores tubulares, de vidro, com 60 cm de altura e 7 cm de diâmetro interno, com volume útil de 2L. Os reatores foram vedados com tampa em PVC, adaptada com o tubo em aço inoxidável, que conduzia o afluente até o fundo do reator. A configuração dos reatores adotada foi a de biofiltro anaeróbio preenchidos com mini-biobobs operados em fluxo ascensional, com alimentação contínua, conforme mostrado nas **Figuras 4.6 e 4.7** .

Outros três tubos em aço inoxidável estão adaptados à tampa, o primeiro (a 35 cm do fundo do reator) para introdução de nitrogênio gasoso, com o objetivo de evitar o contato do meio de cultura com o ar atmosférico e uma eventual contaminação por oxigênio. O segundo tubo encontra-se conectado à garrafa lavadora de gases, e o terceiro permanece lacrado podendo ser utilizado em qualquer eventualidade.

Foi projetada uma abertura, central, na tampa para ser aberta apenas durante a coleta de material para análises no decorrer do experimento.

O reator possui duas aberturas laterais, uma delas conectada ao frasco de coleta do efluente (galão de polietileno com volume de 10L) e a outra permanece lacrada.

A bomba peristáltica modelo Minipuls 3, marca Gilson com conexões de silicone foi utilizada para alimentação do bioreator .

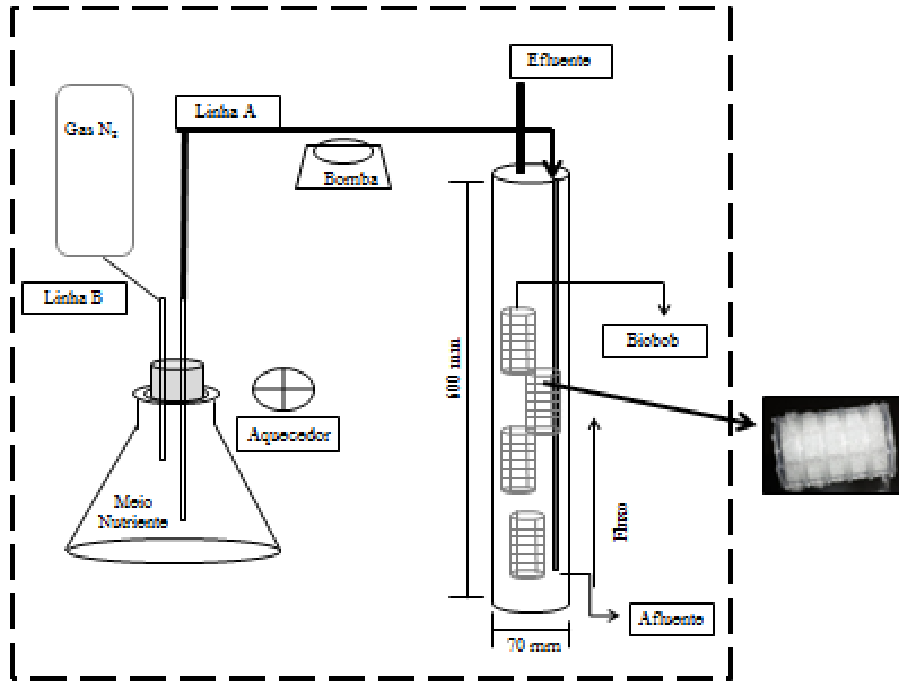


Figura 4.6 - Desenho esquemático do aparato experimental

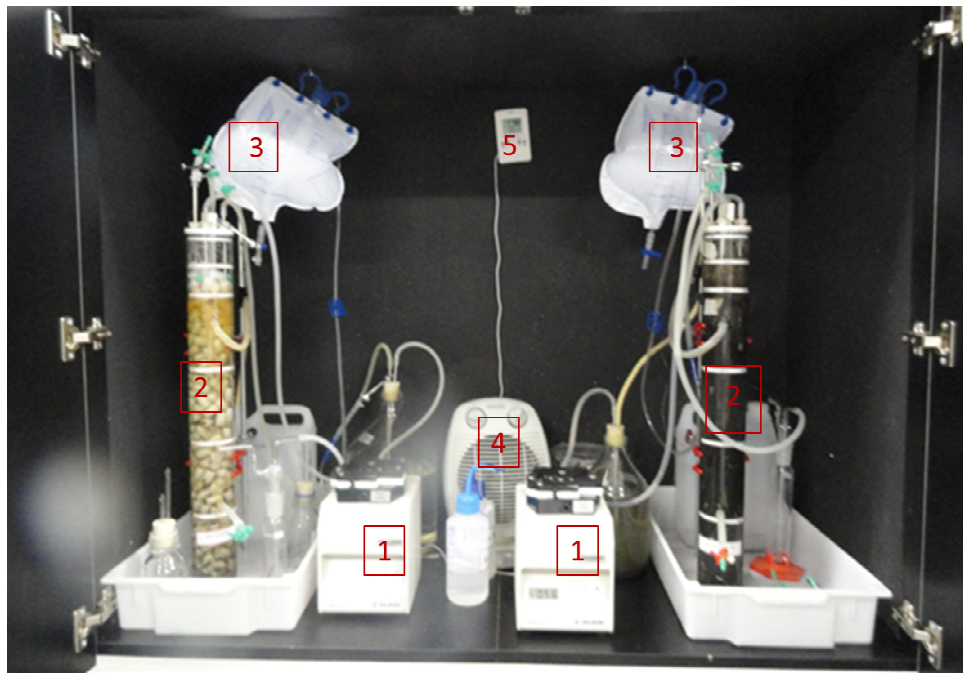


Figura 4.7 – Foto do aparato experimental no interior da câmara climatizada com identificação das principais unidades: 1- bombas peristálticas; 2- biofiltros; 3- bolsa de gás; 4-aquecedor; 5- termômetro

O material suporte adquirido foi o mini-biobob, (BIOPROJ, Tecnologia Ambiental Ltda), produzido com suporte em prolipropileno injetado e espuma de poliuretano flexível expandido.

O frasco para armazenamento do meio de cultura que alimentava o reator foi inicialmente o frasco de 5L (Schott), após o aumento de vazão foi utilizado o galão de 10 L. Ambos foram mantidos totalmente vedados, sendo a tampa de borracha perfurada, adaptada a dois tubos em aço inox, utilizados como conectores de alimentação e introdução de gases através de uma bolsa de gás ( bolsa coletora de urina) . O gás utilizado nessa bolsa foi o N<sub>2</sub> com o objetivo de ocupar o espaço gerado no frasco de alimentação, a medida que o meio afluyente fosse consumido.

Todo esse aparato foi colocado no interior de uma câmara escura, isolada com isopor, objetivando a manutenção da temperatura e a proteção contra a luz.

A temperatura foi mantida em torno de 33-35 °C via um aquecedor/ventilador elétrico (DeLonghi) e medida por um termômetro digital .

#### **4.10 - Inóculo e operação dos bioreatores**

Após a obtenção das amostras selecionadas para inóculo dos reatores, novas análises moleculares e físico-químicas foram realizadas. Até a liberação desses resultados as amostras foram armazenadas em câmara fria a 4°C. Partes das amostras foram congeladas a -80 °C para análises moleculares.

Após a liberação dos resultados das análises físico-químicas, foi definido a quantidade de lodo necessária para o inóculo dos reatores .

Antes de ser inoculado, cada lodo foi centrifugado a 2500rpm por 30 min e o sobrenadante descartado. Em seguida o *pellet* foi ressuspensionado em meio nutriente (com constituição semelhante à apresentada por van der Graaf *et al.* (1996), Dapena Mora *et al.* (2004), porém, sem amônia, nitrito e nitrato, e novamente centrifugado 2500 rpm por 30min . Esse passo foi repetido duas vezes. É importante ressaltar que, antes de utilizar o meio de cultura, este foi fluxionado com N<sub>2</sub> por 15min para reduzir a presença de O<sub>2</sub>. Após a última lavagem, a biomassa foi ressuspensionada em meio de cultura (para Anammox) autotrófico e bombeado para

o interior dos bioreatores. O material suporte (mini-biobob) foi previamente introduzido no reator.

A **Tabela 4.6** apresenta a constituição do meio nutriente usado. Já a **Tabela 4.7** mostra a composição das soluções de micronutrientes que constituem o meio basal.

Para o reator que recebeu o Lodo II, chamado de RII, o material suporte foi submergido no lodo por 30 min, em seguida, introduzido no reator. O período de recirculação desse meio de cultura foi de cinco dias.

**Tabela 4.6** - Composição do meio mineral autotrófico

Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> Cl ou (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Variado
NaNO <sub>2</sub>	Variado
KHCO <sub>3</sub>	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,027
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,18
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3
Solução de micronutrientes I	1,0 mL
Solução de micronutrientes II	1,25 mL

Fonte: Dapena-Mora (2004)

**Tabela 4.7** – Composição das soluções de micronutrientes

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

Fonte: Dapena-Mora (2004)

Para ajustes nos problemas de funcionamento e operação dos reatores, o tempo de detenção hidráulica (TDH) era alterado. Nos dias de fluxo interrompido (por problemas hidrodinâmicos), era necessário operar o bioreator em batelada. Assim que o problema era solucionado, o fluxo contínuo era reestabelecido.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) dos reatores foi reduzido gradualmente de 48 horas para 12 e depois para 8h horas, em ambos os reatores (na maior parte do estudo). O período de 8 h como TDH foi estabelecido em função da cinética de consumo dos substratos N-  $\text{NH}_4^+$  e N-  $\text{NO}_2^-$  realizada para os dois reatores. Essa cinética consistiu em coletar amostras de cada reator por 17 horas seguidas, com intervalos de 1 h.

A correção do pH do reator foi realizada variando a concentração de bicarbonato no afluente.

A carga volumétrica de nitrogênio aplicada foi gradualmente aumentada em ambos os reatores de 30 para 1300 mg N d<sup>-1</sup>.

#### **4.11 - Monitoramento físico-químico dos bioreatores**

Para o monitoramento analítico dos bioreatores foram medidos o pH, concentração de amônia e nitrito, afluentes e efluentes.

Para o monitoramento da dinâmica de amônia e nitrito dos reatores foi coletado 1 mL do efluente, inicialmente, três vezes por semana. Após estabilidade do funcionamento dos reatores, as coletas de amostras passaram a ser realizadas duas vezes por semana. Em momentos de instabilidade, quando ocorria alteração brusca de pH e/ou deficiência de remoção de amônia, as coletas eram feitas 4 vezes por semana.

Os métodos analíticos utilizados nas análises físico-químicas durante os experimentos estão resumidos na **Tabela 4.8**.

**Tabela 4.8** - Métodos analíticos utilizados

<b>Análise</b>	<b>Método e Referência</b>	<b>Equipamento</b>
Nitrito	Método colorimétrico do ácido sulfanílico 4500-B do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2012)	Espectofotômetro DR2800 Hach
Amônia	Método do Fenato 4500 NH <sub>3</sub> - F do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2012)	Espectofotômetro DR2800 Hach
pH	Método 4500-H <sup>+</sup> - B do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2012)	Medidor de pH de HANNA

#### 4.12 - Monitoramento microbiológico dos bioreatores por Pirosequenciamento

A técnica de pirosequenciamento foi utilizada para análise da diversidade bacteriana desenvolvida nos reatores RI e RII após período de cultivo de 440 dias.

A extração de DNA genômico encaminhado para pirosequenciamento foi realizada com o kit comercial Power Soil DNA Kit, Mo Bio laboratórios, Inc., Carlsbad, CA, EUA, seguindo as instruções do fabricante.

A quantidade de DNA foi estimada utilizando espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*). Foram utilizadas amostras de DNA 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 além dos *tags* e *primers* designados para cada amostra. O par de *primers* 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 pela INDEAR, para a análise dos dados obtidos no pirosequenciamento.

O tratamento das amostra e dados consistiram em:

- a) Seleção das sequências com tamanho maior que 200 pb e coeficiente de qualidade superior a 25.

- b) Das sequências restantes, foram extraídas aquelas que possuíam o *barcode* específico com uma tolerância de até 2 pb de erro. Uma vez identificado o *barcode*, o mesmo foi removido.
- c) Nas sequências selecionadas, identificou-se a sequência correspondente ao tag e iniciador *foward*, que foi removido, com tolerância de erro de até 3 substituições .
- d) Buscou-se também o iniciador *reverse*, removendo-o. Caso o iniciador *reverse* não fosse encontrado, removeu-se apenas o *tag*.
- e) Em seguida, foram removidas as sequências que possuíam homopolímeros maiores ou iguais a 6 e as sequências que apresentaram (no mínimo) uma base ambígua.

Uma vez selecionadas, as sequências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). A definição das UTOs pelo método *Uclust* (EDGAR, 2010), utilizou o limite de 97% de similaridade. Em seguida, as sequências representativas de cada UTO foram selecionadas pelo *software* QIIME e a classificação pela base de dados RDP-*classifier* (Ribossomal Database Project) (<http://rdp.cme.msu.edu/>), adotando o limite de confiança igual a 0,05.

As medidas de diversidade alfa da amostra (dominância, Chao 1, equitabilidade, Shannon-Wiener e Simpson) foram calculadas. Os índices de Simpson, dominância e equitabilidade foram calculados por meio do *software* QIIME e o índice Shannon-Wiener foi determinado utilizando a ferramenta RDP - *Pyrosequencing Pypeline* (<http://pyro.cme.msu.edu>). As UTOs foram classificadas como apresentando uma ou duas sequências (UTOs simples e duplas). Os índices de Beta diversidade Bray Curtis e Jaccard foram calculados utilizando o *software* QIIME.

A árvore filogenética foi construída pelas sequências representativas das UTOs relacionadas às 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.*, 2007). As análises de *bootstrap* contendo 1.000 réplicas foram realizadas para verificar e estimar a confiabilidade e o arranjo da árvore filogenética.



## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### **5.1 - Introdução**

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados referentes às análises de detecção molecular das bactérias Anammox pela PCR a partir das diferentes amostras de lodo coletadas, no CePTS e na REGAP. São apresentados os resultados das análises dos parâmetros físico-químicos dos lodos selecionados para inóculo, bem como a diversidade das bactérias Anammox encontrada nos mesmos. Por último, os resultados do desenvolvimento das Anammox nos dois reatores de leito fixo, a partir dos dois inóculos selecionados, a eficiência de remoção de amônia e de nitrito ao longo do tempo de operação, bem como a caracterização da comunidade bacteriana desenvolvida nos reatores.

#### **5.2 – Seleção dos Inóculos**

- **Detecção das bactérias Anammox pela técnica PCR**

O parâmetro de seleção dos lodos de inóculo foi a amplificação positiva em todos os *primers* testados incluindo o par específico para o gene *hzo*, que codifica a enzima *hidrazina oxidoreductase* das bactérias Anammox (*primers* hzoF1/Anahzo2R), uma vez que os *primers* específicos para o gene RNAr 16S de Anammox (*primers* Pla46f/Amx667r, Pla 46f/ Amx 820r, Pla 46f/ Amx1240) podem amplificar o DNA de organismos pertencentes ao grupo dos Planctomicetos e não somente das Anammox (HIRSCH *et al.*, 2010).

As quatro amostras coletadas na planta de tratamento de efluentes da REGAP apresentaram resultados positivos para a PCR com todos os *primers* testados, tanto para os *primers* específicos para o gene RNAr 16S de Anammox e Planctomicetos, quanto para o par de *primer* específico para o gene *hzo* (**Tabela 5.1**).

**Tabela 5.1** – Resultados das amplificações por PCR das amostras coletadas na REGAP.

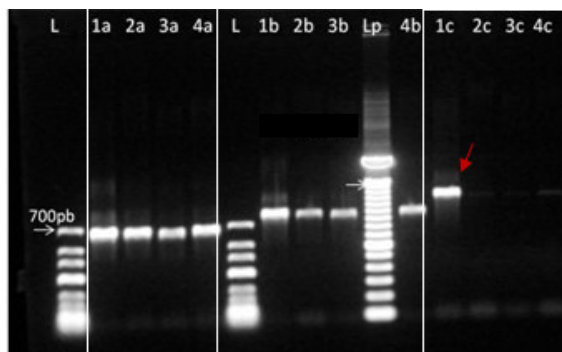
Ponto de amostragem	Local	<i>Primers/ especificidade</i>			
		Pla46F/ Amx667R Gene RNAr 16S	Pla46F/ Amx 820R Gene RNAr 16S	Pla 46F/ Amx1240R Gene RNAr 16S	hzoF1/ Ana hzo2R Gene <i>hzo</i>
Lagoa Aerada Norte	REGAP	+	+	+	+
Biodiscos	REGAP	+	+	+	+/-
Lagoa de Ibirité	REGAP	+	+	+	+/-
Bombas de distribuição	REGAP	+	+	+	+/-

(+) Resultados positivos para os produtos amplificados na PCR visualizados em gel agarose 1%

(+/-) Resultados positivos com fragmentos visualizados sem nitidez no gel de agarose

De acordo com os resultados obtidos, somente a amostra coletada na Lagoa Aerada Norte apresentou forte banda de DNA amplificado na PCR utilizando os *primers* específicos para *hzo*, conforme pode ser visualizado na canaleta (1c) da eletroforese em gel de agarose 1% da **Figura 5.1**.

Tem sido demonstrado na literatura que a utilização de *primers* relacionados a genes funcionais, como o gene que codifica a enzima hidrazina oxidoreductase (*hzo*), é mais específica para a detecção das bactérias Anammox quando comparados com *primers* para o RNAr16S (LI *et al.*, 2010)



**Figura 5.1** – Eletroforese em gel de agarose 1% com o resultado da PCR das amostras dos lodos coletados na REGAP utilizando primers específicos para o RNAr16S e *hzo*. *Primers* utilizados:(a): Pla 46f/Amx667r, (b) Pla46f/Amx820r e (c) hzoF1/Anahzo2R. Canaletas:L - *Low range ladder*; 1-Lagoa aerada; 2- Biodiscos; 3 – Lagoa de polimento de Ibirité; 4- Sala de bombas; Lp- 100bp *ladder plus*.

O gene *hzo* desempenha papel chave na bioquímica do processo Anammox mediando a reação que transforma a hidrazina em gás nitrogênio (HIRSCH *et al*, 2010). Esse gene funcional está presente em todas as espécies de Anammox estudadas (Li *et al.*,2010).

A **Tabela 5.2** apresenta os resultados de detecção das Anammox pela PCR a partir das amostras de lodo coletadas no CePTS, utilizando os pares de *primers*: Pla46f/ Amx667r, Pla 46f/ Amx820r, Pla 46f/ Amx1240r e hzoF1/Anahzo2R.

**Tabela 5.2** – Resultados das amplificações por PCR das amostras coletadas no CePTS.

Ponto de amostragem	Local	<i>Primers/ especificidades</i>			
		Pla46f/ Amx667r Gene RNAr 16S	Pla46f/ Amx 820r Gene RNAr 16S	Pla 46f/ Amx1240r Gene RNAr 16S	hzoF1/ Ana hzo2R Gene <i>hzo</i>
Lagoa de Polimento 1A*	CePTS	+	-	-	-
Lagoa de Polimento 1B*	CePTS	+	+	+	-
Lagoa de Polimento 2 <sup>a</sup> *	CePTS	+	+	+	-
Lagoa de Polimento 2B*	CePTS	+	+	+	-
Lagoa de Polimento 3 <sup>a</sup> *	CePTS	+	+	+	-
Lagoa de Polimento 3B*	CePTS	+	+	+	-
Wetland não plantado 40 cm**	CePTS	+	+	-	-
Wetland não plantado 45 cm**	CePTS	+	+	-	-
Wetland não plantado 50 cm**	CePTS	+	+	+	+
Wetland Plantado 40 cm**	CePTS	+	+	+	-
Wetland Plantado 45 cm**	CePTS	+	+	+	+
Wetland Plantado 50 cm**	CePTS	+	-	-	-
UASB – 1A***	CePTS	-	-	-	-
UASB – 1B***	CePTS	-	-	-	-
UASB – 1C***	CePTS	+	+	+	-
UASB – 2****	CePTS	+	+	+	-
UASB – 3****	CePTS	-	-	-	-
UASB – 4 <sup>a</sup> ****	CePTS	-	-	-	-
UASB – 4B****	CePTS	+	+	+	-

(+) Resultados de amplificação positiva para os produtos da PCR visualizados em gel de agarose 1%.

(-) Resultados negativos, nenhum produto da PCR foi amplificado.

\* A e B: 7 e 10 metros de distância em relação ao ponto de entrada do afluente, respectivamente.

\*\* 40-45-50 :Diferentes profundidades (cm) amostradas nas *wetlands*.

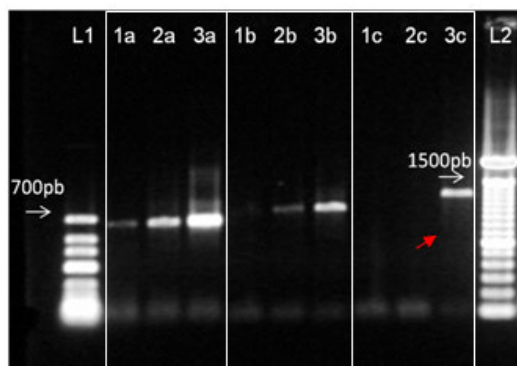
\*\*\* A, B e C: Câmaras A ,B e C do reator UASB 1, respectivamente.

\*\*\*\* A e B: Câmaras A e B do reator UASB 4, respectivamente.

As amostras de sedimentos coletados nas três Lagoas de Polimento do CePTS apresentaram amplificação positiva com os *primers* específicos para os genes de RNAr16S, mas não para o gene *hzo*.

As amostras de lodos coletadas nos reatores UASB apresentaram diferentes respostas de amplificação. As amostras de lodo dos UASB 1C, 2 e 4B, apresentaram resultados positivos na amplificação com *primers* específicos para o gene RNAr16S, mas negativos para os *primers* que codificam porção do gene *hzo*. As amostras dos reatores UASB 1A, 1B, 3 e 4A não amplificaram com todos os *primers* testados, sugerindo que as bactérias Anammox não estão presentes nesses lodos dos reatores UASB. Em quase todas as amostras testadas com os *primers* específicos para o gene RNAr16S, os resultados foram positivos, exceto para os lodos dos reatores UASB 1A e 1B, 3 e 4A.

As amostras de lodos coletados nas *wetlands* construídas plantadas e não plantadas, coletadas em diferentes profundidades, apresentaram resultados positivos na amplificação utilizando os *primers* específicos para o DNA de RNAr 16S, mas somente as amostras da *wetland* não plantada a 50cm de profundidade e o *Wetland* plantado a 45cm de profundidade apresentaram resultado positivo para o gene *hzo*.



**Figura 5.2** –Eletroforese em gel de agarose 1% do resultado da PCR das amostras de lodos coletados na *wetland* não plantada - CePTS, utilizando primers específicos para o RNAr16S e *hzo*. *Primers* utilizados:(a): Pla 46f/Amx667r, (b) Pla 46f/Amx 820r e (c) hzoF1/Anahzo2R. Canaletas:L1 – marcador de peso molecular *Low range ladder*. 1- *Wetland* não plantada 40cm; 2- *Wetland* não plantada 45cm; 3 - *Wetland* não plantada 50cm, L2- marcador de peso molecular 100bp *ladder plus*.

Dentre as vinte e três amostras testadas, dezessete amostras amplificaram com no mínimo dois pares de *primers* específicos para porção do gene RNAr16S das Anammox. Duas amostras, Lagoa de Polimento 1A e *Wetland* plantada 50cm apresentaram resultados positivos de amplificação com apenas um par *primer* (Pla 46F/ Amx667R).

Quatro amostras de DNA isoladas dos reatores UASB 1A, 1B, 3 e 4A, não amplificaram com todos os *primers* testados e seis amostras (Lagoa Aerada, Biodiscos, Lagoa de Ibirité, Sala de distribuição para biodisco (Sala de Bombas), *Wetland* (não plantado 50 e plantado 45) amplificaram com todos os *primers* testados.

Os resultados positivos de amplificação nas reações de PCR para os diferentes pares de *primers* testados indicam que o processo Anammox pode estar ocorrendo nesses sistemas de tratamento de efluentes domésticos wetland (DONG & SUN, 2007) e industriais e o lodo correspondente poderia ser usado como inóculo de reatores para enriquecimento de bactérias Anammox.

Portanto, para o inóculo dos reatores RI e RII foram usados aqueles lodos que apresentaram resultados positivos com todos os pares de primers testados e principalmente positivo ( forte banda) para o primer que detecta o gene funcional (*hzo*), que foram o lodo da Lagoa de Aeração Norte da REGAP e lodo da *Wetland* construída, não Plantada 50cm – CePTS.

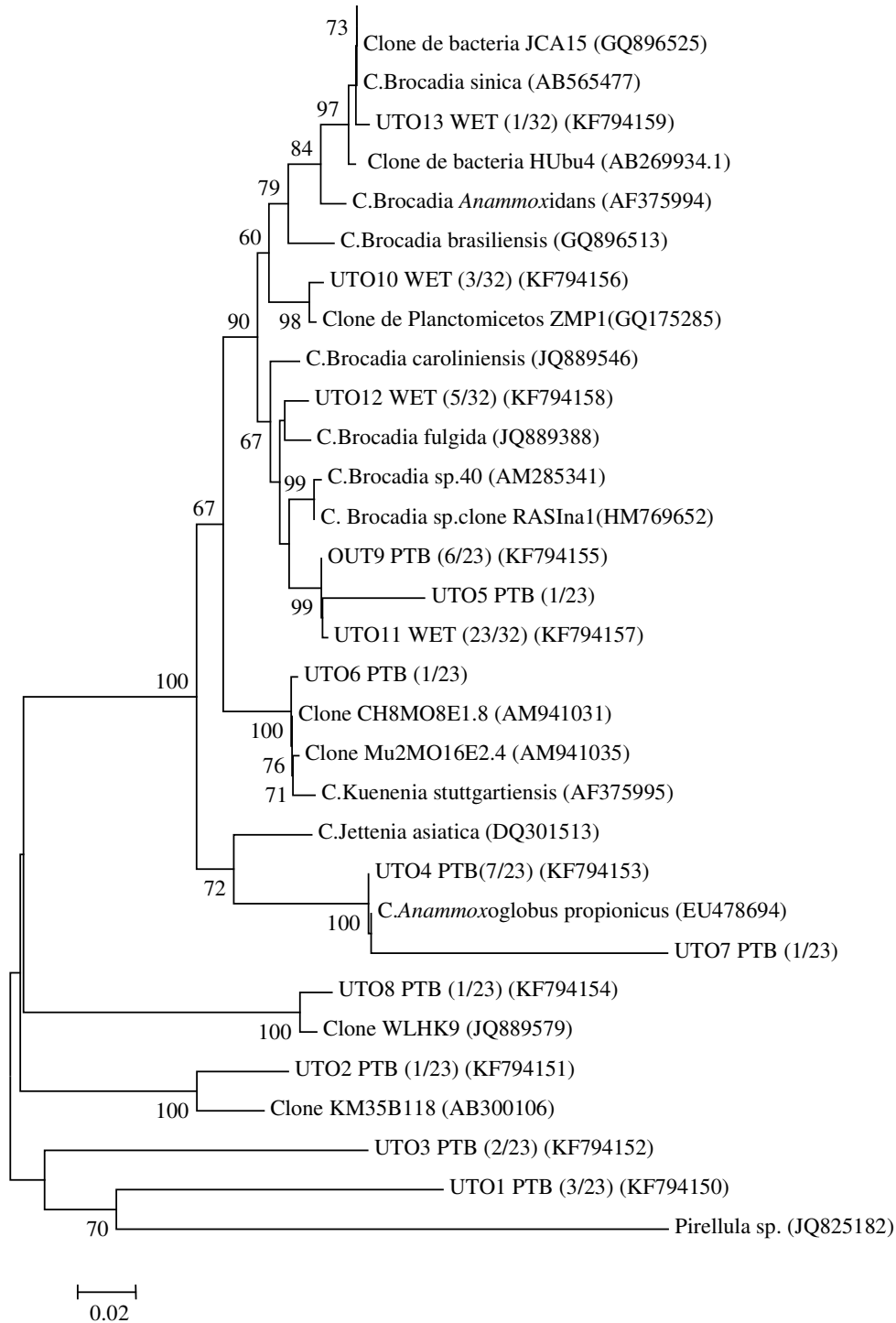
### **5.3 - Análise da diversidade das bactérias Anammox nos inóculos**

Para confirmar a ocorrência e analisar a diversidade das Anammox presente nos lodos usados como inóculos (*Wetland* NP-50 e REGAP), duas bibliotecas de clones foram construídas a partir dos produtos de PCR obtidos com o par de *primers* específico para o gene RNAr 16S de Anammox ( Pla 46f /Amx 820r). As sequências do gene RNAr 16S obtidas foram alinhadas com sequências de organismos Anammox já depositadas no BLAST.

As duas amostras apresentaram composição e diversidade de Anammox diferentes. A amostra de lodo da wetland (NP-50) apresentou menor diversidade de Anammox quando comparada à diversidade encontrada na amostra de lodo da Lagoa Aerada da REGAP. Esta conclusão foi suportada pelos resultados dos índices de diversidade de Shannon, Simpson e Chao (**Tabela 5.3**). O índice de Shannon indicou que a biblioteca de clones do CePTS possuía diversidade menor que a biblioteca obtida da amostra da REGAP. Esse resultado foi corroborado pelo índice Simpson (quanto maior, maior a dominância e menor a diversidade). Portanto, maior diversidade de Anammox foi encontrada na amostra de lodo da REGAP.

Trinta e dois clones foram selecionados aleatoriamente da biblioteca construída a partir do lodo coletado no CePTS (*wetland*).

A proximidade filogenética dos grupos encontrados são mostrados na árvore filogenética representada na **Figura 5.3**.



**Figura 5.3** – Árvore filogenética das UTOS relacionadas às bactérias *Anammox* mostrando as posições dos clones obtidos dos lodos *wetland* e REGAP. A árvore foi gerada usando o

fragmento de 774 pb do RNAr 16S pelo método *neighbor-joining*. A barra de escala representa uma divergência de 2% na *sequência*. *Pirellula sp.* foi utilizada como *outgroup*. Os números dos nós da árvore representam 1000 análises de *Bootstrap*. Para as UTOs, estão indicadas entre parênteses o número de sequências relacionadas. Os números de acesso das *sequências* depositadas no *GenBank* se encontram entre parênteses

A cobertura desta biblioteca foi de 96 %. As 32 sequências foram agrupadas em quatro UTOs apresentando pelo menos 95% de identidade entre as sequências relacionadas .

Vinte e três clones foram selecionados aleatoriamente a partir da biblioteca construída com a amostra de lodo REGAP. Estas sequências foram agrupadas em nove UTOs com pelo menos 92% de identidade de sequência. A cobertura desta biblioteca foi de 78 %.

A comunidade Anammox da amostra da *Wetland* construída foi dominada por único gênero Anammox, *Candidatus Brocadia*, enquanto a amostra REGAP contou com a presença de três gêneros de Anammox: *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Kuenenia* e *Candidatus Brocadia*, com predominância de *Ca. Anammoxoglobus* e *Ca. Brocadia* .

Para o inóculo *wetland* as sequências de UTO 11WET e UTO 12WET foram relacionadas entre si e representaram 87 % do total de clones. Essas sequências foram relacionados à *Ca. Brocadia sp. 40*, *Ca. Brocadia fulgida*, *Ca. Brocadia carolinienses* e outras espécies encontradas em reatores Anammox inoculados com lodo de esgoto sanitário ETE (HM769652) e lodo de nitrificação (AM285341).

**Tabela 5.3** – Índices Shannon, Simpson e Chao referente as amostras inoculadas em RI (*wetland* -CePTS) e RII (Lagoa aerada -REGAP).

Índices /Origem das amostras	CePTS	REGAP
Shannon	0,84	1,88
Simpson	0,55	0,15
Chao1	4	11

Para a biblioteca construída a partir do lodo REGAP, cerca de 26% (6/23) e 30,% (7/23) das sequências foram agrupadas nas UTO 9PTB e UTO 4PTB, respectivamente. As sequências dessas UTOs foram intimamente relacionadas às sequências de *Ca. Brocadia* e *Ca. Anammoxoglobus propionicus*, respectivamente. Estudos anteriores sugeriram que culturas

enriquecidas que apresentem os gêneros *Anammoxoglobus* e *Brocadia* estão mais bem adaptadas à presença de compostos orgânicos (JETEN *et al.*, 2009, KARTAL *et al.*, 2011). Outro estudo recente relatou a prevalência de *Ca. Brocadia* em águas subterrâneas contaminadas, sugerindo a adaptação metabólica desse grupo Anammox, em particular, a esse nicho ecológico (MOORE *et al.*, 2011). Combinado à presença de fenol (11.8mg L<sup>-1</sup>), cianeto (0,07 mg L<sup>-1</sup>), sulfeto (0,09 mg L<sup>-1</sup>) e os óleos e graxas (655 mg L<sup>-1</sup>) próximos ao ponto de amostragem da Lagoa Aerada – REGAP, (comunicação pessoal de Zanette-REGAP), os resultados desse trabalho sugerem uma ampla capacidade das bactérias Anammox em lidar com compostos que podem ser tóxicos para a maioria dos microrganismos.

As sequências da UTO6 apresentaram 97% de homologia com as sequências de *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* e homologia com sequências recuperadas em fonte hidrotermal, no mar profundo (Número de acesso AM941031 e AM941035), o que é interessante, especialmente considerando que o lodo REGAP foi coletado numa estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo onde estão ocorrendo processos de alta temperatura..

Pesquisas anteriores mostraram que comunidades Anammox apresentam baixa diversidade em resposta à mudança de concentração salina e substratos de carbono disponíveis nesses ecossistemas (KARTAL *et al.*, 2007). No entanto, neste estudo, a diversidade Anammox foi maior na amostra coletada na lagoa de refinaria de petróleo (REGAP), em comparação à amostra da *wetland* construída. Este achado sugere que a diversidade de bactérias Anammox foi influenciada, positivamente, por fatores ambientais, como a presença de diferentes fontes de carbono e outros compostos como fenóis, sulfetos, cianeto, óleos e graxas frequentemente encontradas em efluentes de refinaria de petróleo, além da maior concentração de amônia. Embora, LIH (2010) tenha detectado organismos dos quatro gêneros Anammox (*Ca. Anammoxoglobus*, *Ca. Kuenenia*, *Ca. Scalindua* e *Ca. Jettenia*) em reservatórios geotérmicos de óleo subterrâneos, este é o primeiro estudo, tanto quanto sabemos, mostrando a existência de bactérias Anammox numa ETE de refinaria de petróleo.

O próximo passo foi usar esses lodos como inóculos em reatores para desenvolver o processo Anammox e após 440 dias de operação analisar a diversidade microbiana selecionada em função das condições operacionais e comparar com aquela obtida nos inóculos.



## **5.4 – Inóculo, Operação e Desempenho dos bioreatores**

### **5.4.1 - Caracterização físico-química e inóculo dos reatores**

Após definir quais lodos seriam utilizados como inóculos dos reatores foram realizadas análises físico-químicas para definir qual o volume de inóculo deveria ser processado para o inóculo ter a concentração de SST definida  $4\text{gSST.L}^{-1}$  (SCHIERHOLTNETO, 2007). Os resultados das análises físico-químicas desses lodos, para os diversos parâmetros analisados, são apresentados na **Tabela 5.4**. Como previsto, devido às diferenças na origem dos lodos sistema de tratamento de esgoto sanitário e sistema de tratamento de efluente industrial, os resultados foram bastante distintos entre si.

Os sistemas de tratamento de esgoto doméstico e industrial pesquisados tratam efluentes com concentrações de nitrogênio amoniacal em torno de 25-50 mg/L e 35-390 mg/L, respectivamente.

Para o lodo da *wetland* NP-50 a concentração de amônia foi de 61 mg/L e de nitrito  $<0,05\text{ mg/L}^{-1}$ . Na amostra de lodo coletada na Lagoa Aerada – REGAP, as concentrações de amônia e nitrito determinadas foram de 130 mg/L<sup>-1</sup> e  $< 0,05\text{ mg/L}^{-1}$ , respectivamente (**Tabela 5.4**). Porém, o efluente da refinaria, também apresenta em sua constituição, óleos, graxas, fenóis, sulfetos, cianeto, e metais pesados como cromo, ferro, níquel, cobre, molibdênio, vanádio, selênio e zinco (MENDONÇA *et al.*, 2004, SILVA *et al.*, 2012). Portanto, pode-se inferir que a ocorrência e desenvolvimento das bactérias Anammox é possível em ambientes com esses tipos de compostos tóxicos, uma vez que foi detectada por PCR a presença de três gêneros Anammox. Outra curiosidade é a presença das Anammox mesmo em baixas concentrações de nitrito, encontrada para ambos os lodos, uma vez que o nitrito é oceptor final de elétrons resultantes da oxidação anaeróbia da amônia (JETTEN *et al.*, 2009), importante para o metabolismo das Anammox. Na **Tabela 5.4** é apresentado um resumo das características do inóculo bem como das condições operacionais iniciais dos reatores.

As concentrações de sólidos determinadas em cada amostra de lodo subsidiaram a quantidade de lodo a ser inoculada nos reatores RI e RII ( $8\text{ g SST. L}^{-1}$  e  $20\text{ g SST. L}^{-1}$ ) respectivamente. Uma vez que foram centrifugados 7,5 L de amostra coletada na *Wetland* construída e 700 mL da amostra coletada na REGAP.

**Tabela 5.4** – Resultados das análises físico - químicas dos lodos selecionados pra inóculos: coletados na Lagoa de Aeração Norte- REGAP e *Wetland* construída, NP-50 cm - CePTS

Parâmetro	Resultados Lagoa Aerada Norte	Resultados <i>Wetland</i> NP 50cm
Nitrogênio amoniacal	130,16 mg/L	61,4 mg/L
Nitrogênio nitroso	<0,05	<0,05
Óleos e graxas	655 mg/L	-
Oxigênio dissolvido	< 0,20 mg/L	0,54 mg/L
pH	6,95	7,1
Sólidos fixos totais	23700 mg/L	730 mg/L
Sólidos suspensos totais	28900 mg/L	1146,7 mg/L
Sólidos Voláteis totais	23900 mg/L	416 mg/L

Inicialmente, foi previsto neste trabalho colocar a concentração de 4 g SST. L<sup>-1</sup> em ambos os reatores (conforme trabalho de SchierholtNeto, 2007), porém, como RI foi o primeiro a ser inoculado, observou-se que essa concentração poderia comprometer o sucesso do reator, devido à distribuição irregular da biomassa no interior do mesmo. A maior parte da biomassa inoculada em RI ficou concentrada na parte inferior do reator, pela ação da gravidade e a presença do material suporte, mini-biobob. O mini-biobob proporciona maior retenção de biomassa, mas, cria um obstáculo para o fluxo ascendente, principalmente quando o meio afluyente está com maior quantidade de biomassa, como ocorre no momento do inóculo. Contudo, o meio suporte é importante para cultivo das bactérias Anammox por apresentarem longo tempo de duplicação, 11 a 20 dias, aproximadamente.

Com isso, foi decidido alterar a forma de inóculo para RII, não só em relação à concentração de biomassa inoculada (20 g SST.L<sup>-1</sup>), mas também, em relação à forma de inóculo, a qual foi realizada pela parte superior do reator, através da perfuração da tampa (inicialmente, prevista para coleta de mini-biobob), permitindo o fluxo descendente. Essa estratégia permitiu a melhor distribuição da biomassa pelo reator, uma vez que o fluxo descendente gerou maior circulação e contato com o material suporte que pôde reter a biomassa ao longo de todo o reator e não apenas na parte inferior, como aconteceu em RI.

#### **5.4.2 - Dinâmica de compostos nitrogenados no RI**

A **Figura 5.4.** mostra à dinâmica das concentrações de amônia e nitrito afluyente e efluyente ao longo dos 550 dias de operação de RI, inoculado com o lodo coletado a 50 cm de profundidade do sistema de *Wetland* construída – CePTS.

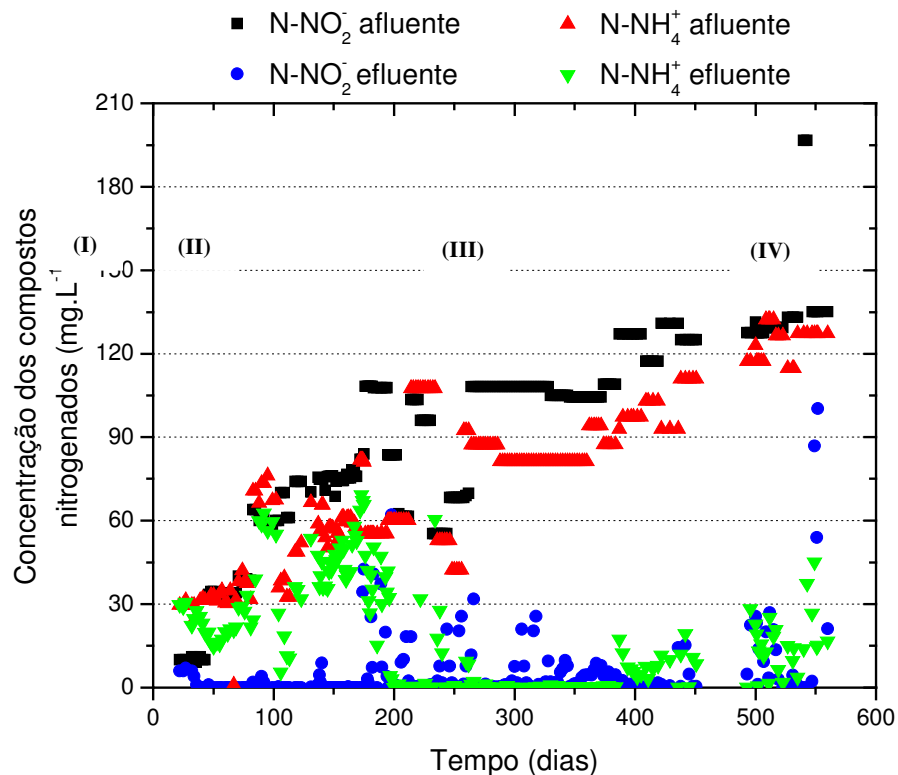
Segundo os perfis de consumo de amônio e nitrito observados em RI pode-se dividir o período operacional em quatro fases:

Fase I - (0-30 dias)- Inóculo

Fase II- (31-210 dias)- Início da remoção simultânea de amônia e nitrito, presença de desnitrificação e reação Anammox.

Fase III-(210-505 dias) - Processo Anammox.

Fase IV-(505-560) - Instabilidade do processo Anammox devido ao aumento de carga de nitrogênio afluente através da redução do tempo de detenção hidráulica.



**Figura 5.4** – Dinâmica dos compostos nitrogenados  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_2^-$  afluente e efluente em RI ao longo do período de operação.

A fase I correspondeu aos 30 primeiros dias de operação que se caracterizaram pela utilização de baixas concentrações de  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_2^-$  afluente com objetivo de minimizar fatores que poderiam inibir o processo Anammox como o acúmulo de nitrito (LOPEZ, *et al* 2008). Não houve remoção simultânea de  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_2^-$  em relação à concentração afluente desses compostos.

Durante a fase II teve início o consumo simultâneo de amônia e nitrito. Não obstante, a média do percentual de remoção de amônia foi de 35% e 98% de nitrito (utilizando a concentração afluyente média de 50mg/L de  $N-NH_4^+$  e 58mg/L de  $N-NO_2^-$ ). **Figura 5.4 e Tabela 5.5.** O consumo intenso de nitrito foi observado em quase todo período de operação independente do consumo de amônia. Isso pode ser atribuído à desnitrificação heterotrófica realizada por bactérias desnitrificantes heterotróficas presentes no lodo, que provavelmente, utilizaram os produtos da lise celular como fonte de carbono.

A concentração afluyente de 60mg/L de amônia e 80mg/L de nitrito foram testadas. Essas concentrações foram menores às utilizadas por MARTINS, (2010) e SHIERHOLTNETO (2007). Esses pesquisadores obtiveram sucesso no enriquecimento e cultivo de bactérias Anammox em reatores de leito fixo com fluxo ascendente e contínuo iniciando a operação com concentrações entre 75 e 100mg/L de amônia e nitrito, respectivamente. No presente estudo, após 11 dias nessa condição, a remoção de amônia foi comprometida e o pH do meio efluyente foi acidificado **Figura 5.5.**

**Tabela 5.5** – Eficiências médias de remoção de nitrogênio durante as fases operacionais de RI

Concentração afluyente $N-NO_2^-$ (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência de remoção média de $N-NO_2^-$	Concentração afluyente $N-NH_4^+$ (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência de remoção média de $N-NH_4^+$
<b>Fase I (0 a 30 dias) - Inóculo e utilização de baixas concentrações de <math>N-NH_4^+</math></b>			
11	40%	30	2%
<b>Fase II (31 a 210 dias) Denitrificação e Anammox</b>			
11-107	98%	30-70	35%
<b>Fase III (210 a 505 dias) - Predominância do processo Anammox</b>			
55-145	95%	60-123	96%
<b>Fase IV (505-560)- Instabilidade do processo Anammox- aumento TDH</b>			
127-145	90%	110-127	83%

Desde o início de operação até o pico máximo de remoção de amônia da fase inicial de operação, o pH se manteve em torno de 7,2. A partir desse ponto o pH caiu atingindo 5,1. Isso coincidiu com a diminuição da atividade Anammox, que segundo JETTEN (2009) se mantém

ativa com pH entre 6.7 a 8.3. Essa relação direta de perda de eficiência de remoção e acidificação do meio efluente, permaneceu ao longo de todo o período de operação do reator.

Mas, com o passar do tempo, uma vez que o meio de cultura e condições operacionais do reator foram direcionadas ao enriquecimento de bactérias Anammox, ocorreu o aumento desse grupo no sistema e ficou estabelecido o consumo simultâneo de  $\text{N-NH}_4^+$  e de  $\text{N-NO}_2^-$  decorrente da maior estabilidade do processo Anammox, caracterizando a Fase -III.

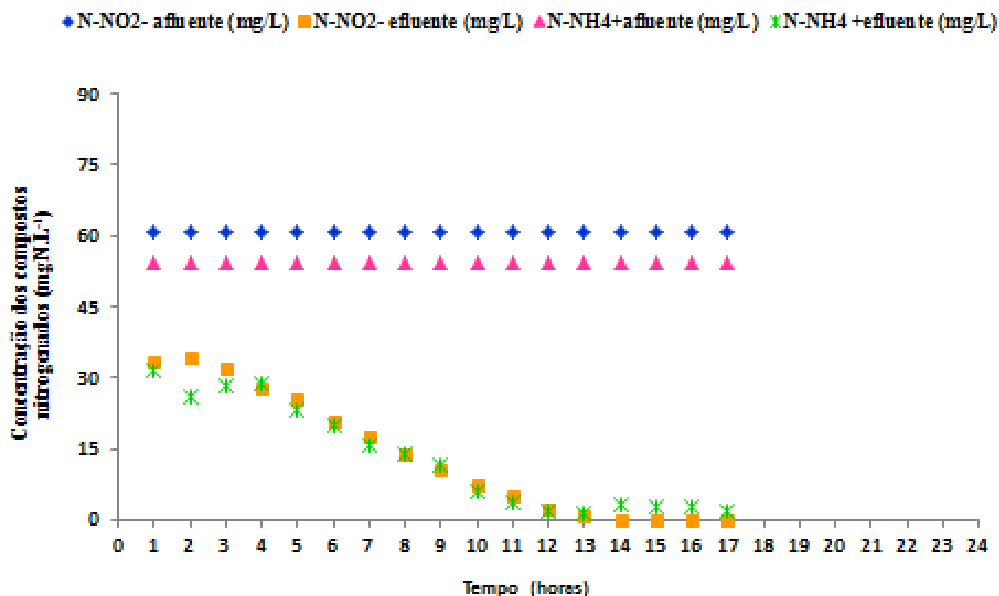
Para avaliar a eficiência do processo Anammox frente a aplicação de cargas crescentes de nitrogênio amoniacal, definiu-se utilizar como primeira opção o aumento de carga através do aumento da concentração desse composto. Portanto as concentrações de nitrogênio amoniacal e nitrito foram sendo gradativamente aumentadas de 30mg/L de  $\text{N-NH}_4^+$  e 11mg/L de  $\text{N-NO}_2^-$  até 110mg/L  $\text{N-NH}_4^+$  e 145mg/L de  $\text{N-NO}_2^-$ . Tais valores eram os previstos, porém, as análises físico-químicas do meio afluente durante o monitoramento apresentavam, em alguns momentos, valores diferentes do programado. Por isso, no gráfico existem pontos fora desses valores esperados de 110 mg/L e 145mg/L para  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$ , respectivamente.

Entretanto, para promover o crescimento da biomassa Anammox e promover maior remoção de amônia, várias tentativas de aumento das concentrações afluentes de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_2^-$  foram feitas por todo o tempo de operação do reator. Mas, o ajuste das concentrações de amônia e nitrito em função do pH e da eficiência de remoção do nitrogênio não permitiram aumento significativo de carga afluente. A cultura exigia um período de tempo maior para adaptação após aumento da concentração afluente dos compostos nitrogenados. Portanto, a estratégia de operação de diminuir o tempo de detenção hidráulica foi adotado para aumentar a carga e possivelmente, a eficiência de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  de RI.

Segundo SCHEEREN *et al.*,2011 a redução do TDH para os reatores Anammox, reduz a competição que pode estar ocorrendo entre essas bactérias com as outras populações microbianas que fazem parte do sistema Anammox, por permitir a lavagem das bactérias mortas e daquelas não aderidas com velocidade de crescimento mais elevadas.

Na fase III, o período próximo ao dia 230 correspondeu à redução de TDH a metade (de 24 horas para 12 horas), provocando diminuição, momentânea, do percentual de remoção de amônia e nitrito. É importante ressaltar que para avaliar se o TDH aplicado estava correspondendo a capacidade de remoção do reator, aos 270 dias de operação foi realizada

uma cinética (**Figura 5.5**), onde foram coletadas amostras dos dois reatores RI e RII, com intervalos de uma hora, por um período de 17 horas. O RI demonstrou que era necessário 12 horas para remover as concentrações afluentes de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  aplicadas.



**Figura 5.5** – Cinética de remoção dos compostos nitrogenados  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  afluente e efluente em RI .

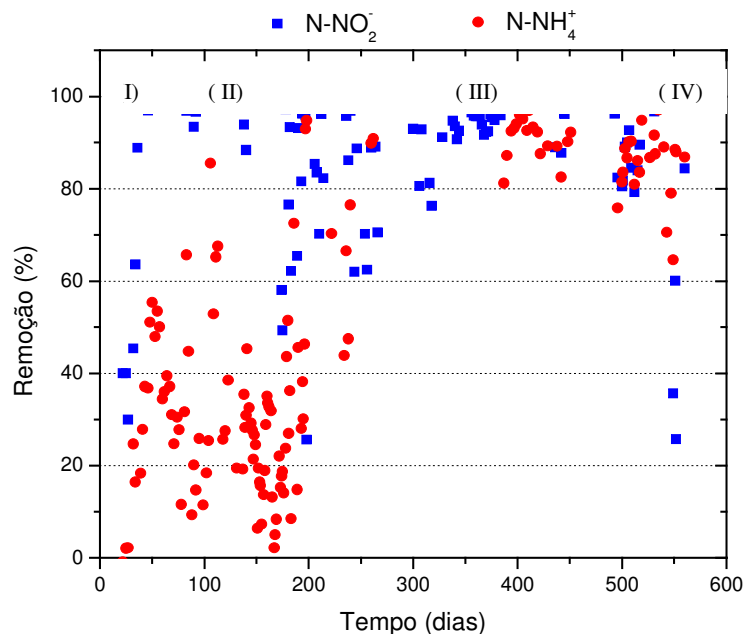
A fase III, que durou 300 dias de operação, permitiu estabilizar a eficiência de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$  em concentrações de 110mg/L e 145mg/L, respectivamente, diminuindo gradativamente o tempo de detenção hidráulica de 48h, para 24h e posteriormente para 12h.

Novamente, na fase- IV, foi testado um aumento de carga de nitrogênio afluente mais acentuado, diminuindo a metade o TDH (de 12 para 6 horas) e mantendo a concentração média afluente de 110mg/L de  $\text{N-NH}_4^+$  e 145mg/L de  $\text{N-NO}_2^-$ . Porém, esse aumento de carga gerou inibição do processo, sugerindo a necessidade de permanecer um tempo maior com a carga menor de amônia e nitrito para aumento da biomassa, para então prosseguir com o aumento de carga.

O comprometimento da remoção afetou principalmente a remoção de nitrito. Vários trabalhos relatam a importância do acompanhamento da concentração de nitrito para a estabilidade do processo Anammox, apesar das concentrações inibitórias encontradas nos diferentes estudos serem variáveis, de acordo com as diferentes condições experimentais e modos de operação

dos reatores Anammox (JIN *et al.*, 2012). Esses estudos apresentam um limite de inibição por nitrito variando entre 5 e 280mg/L. Inicialmente a inibição pode ser reversível, mas se exposto a longo tempo pode se tornar irreversível (ISAKA *et al.*, 2007). Portanto, foi decidido não permanecer nessa condição e aumentar novamente o TDH para 12h. Outra limitação em permanecer com TDH de 6 horas foi a dificuldade com a operação do reator, devido ao volume de 2L. Essa TDH exigia o preparo em larga escala do meio de cultura e a retirada do efluente em horários incompatíveis com a rotina, atual, do laboratório. A automatização do sistema operacional iria permitir maior liberdade de testes relacionados à variação de TDH.

Intercorrências durante o período de operação exigiram algumas adaptações das condições operacionais do reator. Após 175 dias de operação de RI, a vazão do reator em fluxo contínuo foi interrompida. A dificuldade em reestabelecer o fluxo contínuo sem perda de biomassa (devido ao refluxo para o frasco de alimentação do reator) fez com que ele fosse operado em batelada. Portanto, por oito dias foi realizada a retirada de todo o meio líquido presente no interior do reator, para remoção de metabólitos que poderiam inibir o processo e introduzido novo meio de cultura (80mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 66mg/L de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Após essa alteração, a atividade Anammox foi recuperada, sugerindo que as bactérias Anammox estavam se desenvolvendo no reator, mas que ainda não possuíam condições ideais, ou número suficiente para a estabilidade e eficiência do processo Anammox. Após o retorno da atividade Anammox, nova tentativa de aumento das concentrações de nitrogênio afluente foram feitas, a concentração do íon amônio e nitrito afluentes foram aumentadas até atingirem 90mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 110mg/L de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, o percentual de remoção desses compostos ficou em média 92% ( **Figura 5.6**).



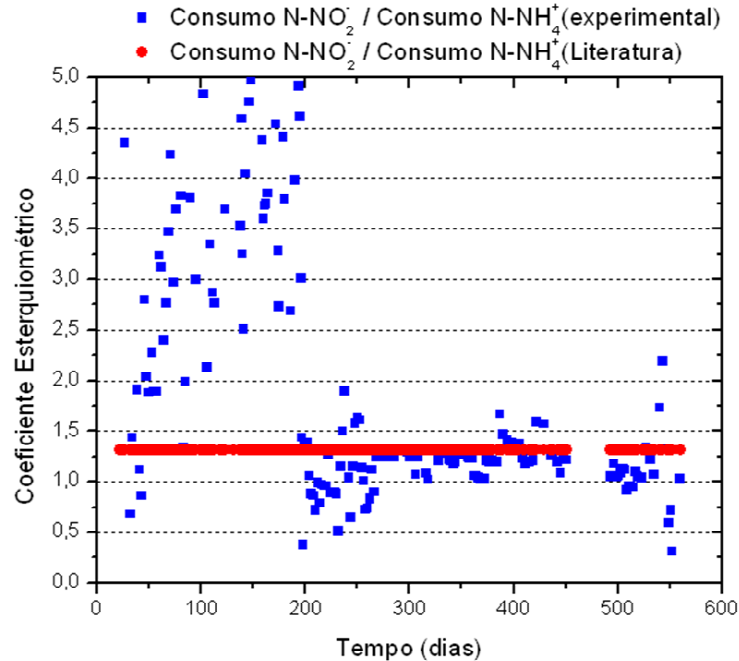
**Figura 5.6** - Percentual de remoção de amônia e nitrito de RI ao longo do período de operação.

O RI alcançou média de remoção em torno de 95%, por longo período (300 dias) quando submetido a aplicação de carga de nitrogênio média de  $350 \text{ g/m}^3\text{d}^{-1}$  ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_2^-$ ).

Após 550 dias de operação, o monitoramento de RI, para esse trabalho, foi interrompido mas apresentava indícios de estabilidade de remoção. Após 550 dias, operação (não monitoramento de amônia e nitrito) foi mantida e foi possível observar a presença de grânulos de coloração alaranjada característica de reatores com enriquecimento de bactérias Anammox ativas (**item 5.4.4**).

O coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito em relação à amônia do RI (**Figura 5.7**), oscilou em principalmente na fase II de operação do reator, alcançando valores em torno 1,6 a partir de 189 dias de operação. A recuperação da atividade Anammox, na fase III, sempre coincidiu com o coeficiente de nitrito em torno de 1,4-1,6. Esse valor se aproxima do valor de 1,32, descrito por STROUS *et al.* (1998).



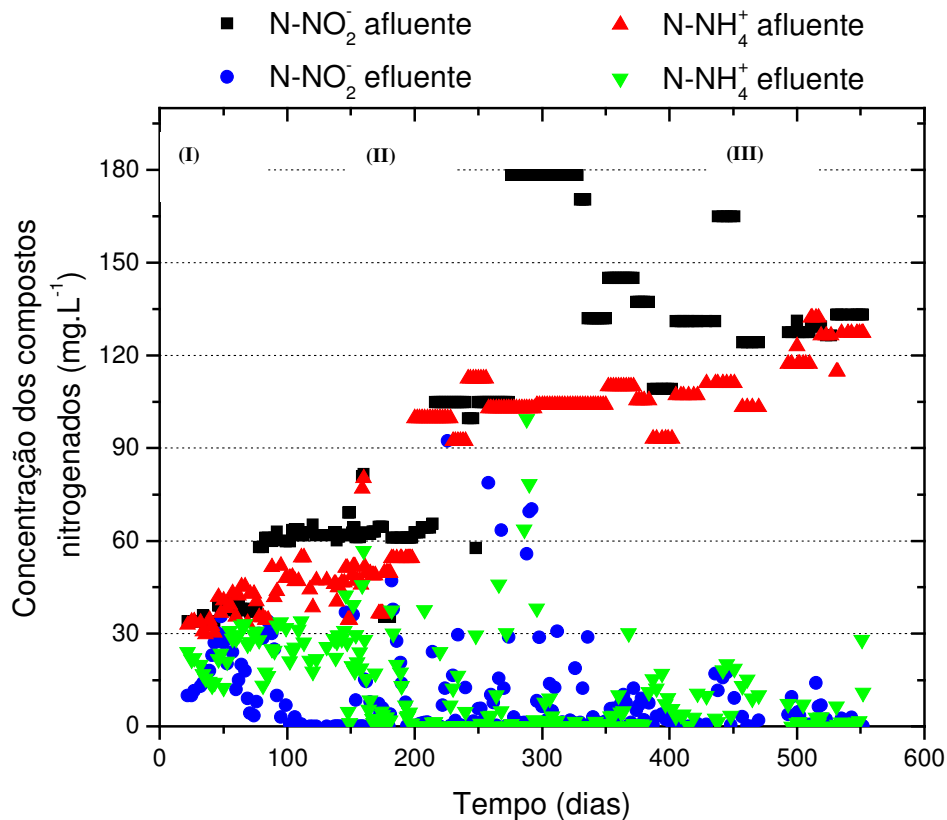


**Figura 5.7** - Evolução do coeficiente estequiométricos do nitrito em relação à amônia ( $\Delta N\text{-NO}_2 / \Delta N\text{-NH}_4$ ) – R- I

### 5.4.3 - Dinâmica de compostos nitrogenados em Reator II

A **Figura 5.8** se refere às concentrações de amônia e nitrito afluente e efluente ao longo de 550 dias de operação do Reator – RII, inoculado com o lodo coletado na Lagoa de Aeração Norte da REGAP/ Petrobras.

Os resultados apresentados para RII foram diferentes daqueles apresentados em RI. A primeira diferença observada foi em relação ao perfil de remoção de nitrito nos primeiros 90 dias de operação, uma vez que, em RII não houve remoção total do nitrito afluente no período inicial de operação (90 dias) como observado em RI (devido a desnitrificação). A remoção de 100% de nitrito teve início após 90 dias de operação, momento no qual teve início também, a remoção de amônia caracterizando o início do processo Anammox.



**Figura 5.8** - Concentração afluyente e efluente de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no RII ao longo do período de operação.

Para RII foi possível destacar 3 fases:

Fase I (0-50 dias) - Inóculo e utilização de baixas concentrações de nitrogênio afluyente, nessa fase não foi observado consumo acentuado de nitrito como em RI.

Fase II (50-300) - Início da remoção simultânea de amônia e nitrito, presença de desnitrificação, em função da remoção total de nitrito não acompanhado pelo consumo de amônia na proporção prevista da estequiometria da reação Anammox (1:1,32). Nessa fase foram feitas várias tentativas de aumentar a concentração afluyente de amônia e nitrito, mas o processo Anammox se manteve instável por até 300 dias de operação.

Fase III (300-550 dias) - Fase de estabilidade do processo Anammox e várias tentativas de aumento de carga (**Tabela 5.6**)

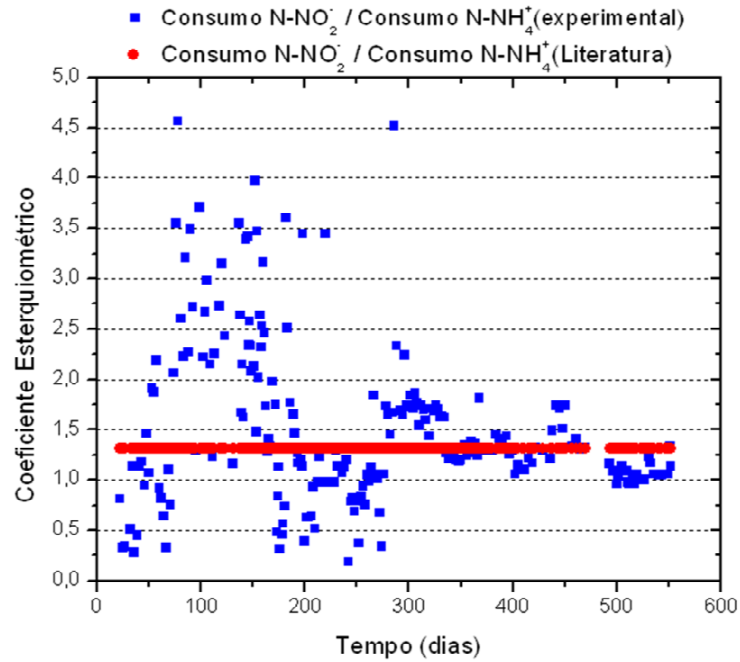
**Tabela 5.6** – Eficiências médias de remoção de nitrogênio durante as fases operacionais de RII.

Concentração afluente N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência de remoção média de N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Concentração afluente N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência de remoção média de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
<b>Fase I (0 a 50 dias) -Inóculo e utilização de baixas concentrações de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>			
30-40	40%	30-40	20%
<b>Fase II- (50 a 300 dias) Desnitrificação e processo Anammox</b>			
39-178	98%	40-112	86%
<b>Fase III -(300 a 550 dias) - Predominância do processo Anammox</b>			
132-178	98%	104-127	97%

Na fase I, utilizando concentração afluente média de para 35 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 35 mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, houve a remoção média de apenas 20% do nitrogênio amoniacal aplicado **Tabela 5.6**. No intervalo entre os dias 90 a 138, quando foi aplicada a concentração de 50mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 66mg/L de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a eficiência de remoção de N- NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ficou em torno de 50 %. Na tentativa de estimular a atividade Anammox decidiu-se aumentar a concentração aplicada de amônia e nitrito para 80 mg/L e 90 mg/L, respectivamente, mantendo o tempo de detenção hidráulica em 48 horas. Isso provocou a inibição de remoção de amônia. Essa concentração foi mantida por 18 dias na expectativa de ocorrer adaptação e possível reversão de inibição. Como essa reversão não foi observada, optou-se por retornar às concentrações anteriores (50mg de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 66mg/L de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) uma vez que foram eficientes no período anterior.

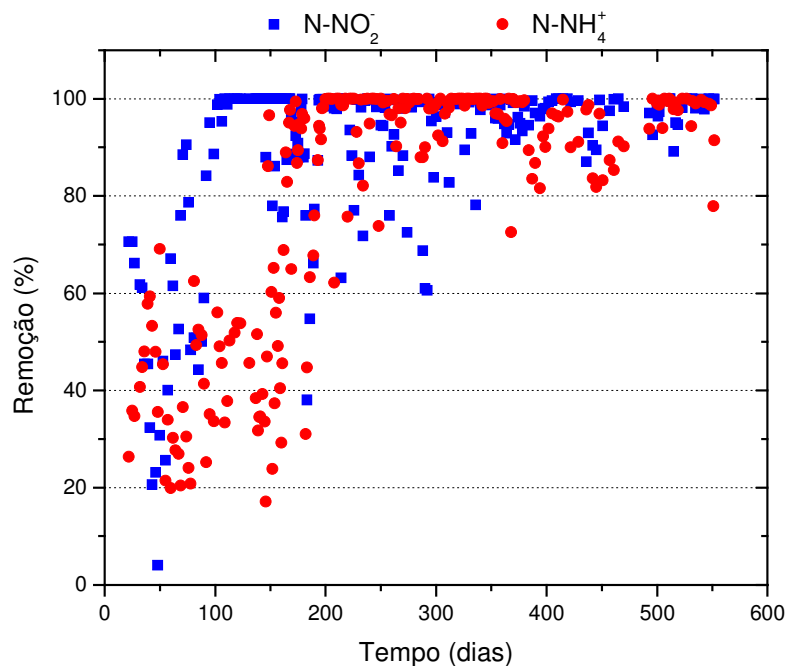
É importante considerar que esse período de redução da atividade Anammox foi o período em que o pH de RII atingiu os menores valores, 6.3 em média. Confirmando o efeito significativo o que o pH exerce sobre a eficiência de remoção da amônia. A remoção de nitrito não foi afetada pela queda do pH. Próximo aos 135 dias de operação a vazão do reator em fluxo contínuo ficou comprometida. Então foi realizada a troca do meio de cultura do reator associada a alteração do modo de operação para batelada, por cinco dias, até o restabelecimento do fluxo contínuo. Novamente, foi recuperada a remoção simultânea de amônia e nitrito, característica da reação Anammox. É novamente, com em RI, essa “lavagem” melhorou, significativamente, a eficiência de remoção de amônia em ambos os reatores. O coeficiente de nitrito nesse momento foi de 1.3 (**Figura 5.9**), demonstrando que

as bactérias cultivadas em RII, após 260 dias de cultivo em meio autotrófico e anaeróbio apresentaram atividade Anammox estável.



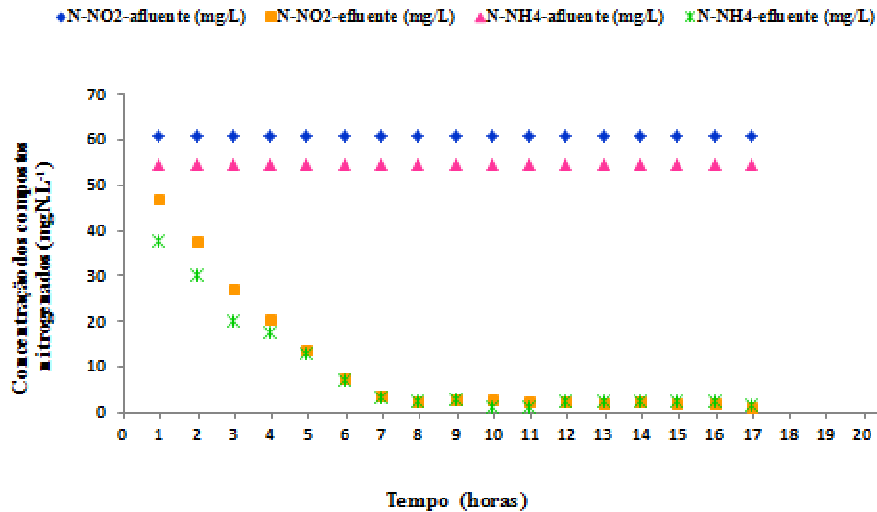
**Figura 5.9** – Evolução do coeficiente estequiométrico do nitrito em relação à amônia do R-II ( $\Delta N\text{-NO}_2 / \Delta N\text{-NH}_4$ )

A **Figura 5.10** apresenta o percentual de remoção de amônia e nitrito do RII ao longo do período de operação. Como descrito para RI, houve variação da concentração afluenta de ( $N\text{-NH}_4^+$  e  $N\text{-NO}_2^-$ ) por todo o período de operação na tentativa de promover o crescimento da biomassa Anammox e maior remoção de amônia.



**Figura 5.10** - Percentual de remoção de amônia e nitrito de RII ao longo do período de operação

A próxima etapa, para o RII foi estabilizar a eficiência de remoção de  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_2^-$  em concentrações baixas, porém, diminuindo gradativamente o tempo de detenção hidráulica (48h para 24h). Uma vez reestabelecida a eficiência de remoção de amônia (pois, o nitrito foi levemente afetado), as concentrações afluentes foram gradativamente aumentadas até atingir 110mg/L de  $N-NH_4^+$  e 145mg/L de  $N-NO_2^-$ , valor máximo alcançado sem o comprometimento da eficiência de remoção. Portanto, a estratégia de aumento de carga foi repetida através das variações de TDH, que passou de 48 h para 24 h, 10h, 8h, 6h. Como discutido anteriormente, foi realizada a cinética também para RII, a qual apresentou resultado de 8h como suficiente para a remoção da concentração de nitrogênio afluente, **Figura 5.11**.



**Figura 5.11** – Cinética de remoção dos compostos nitrogenados  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_2^-$  afluente e efluente em RII .

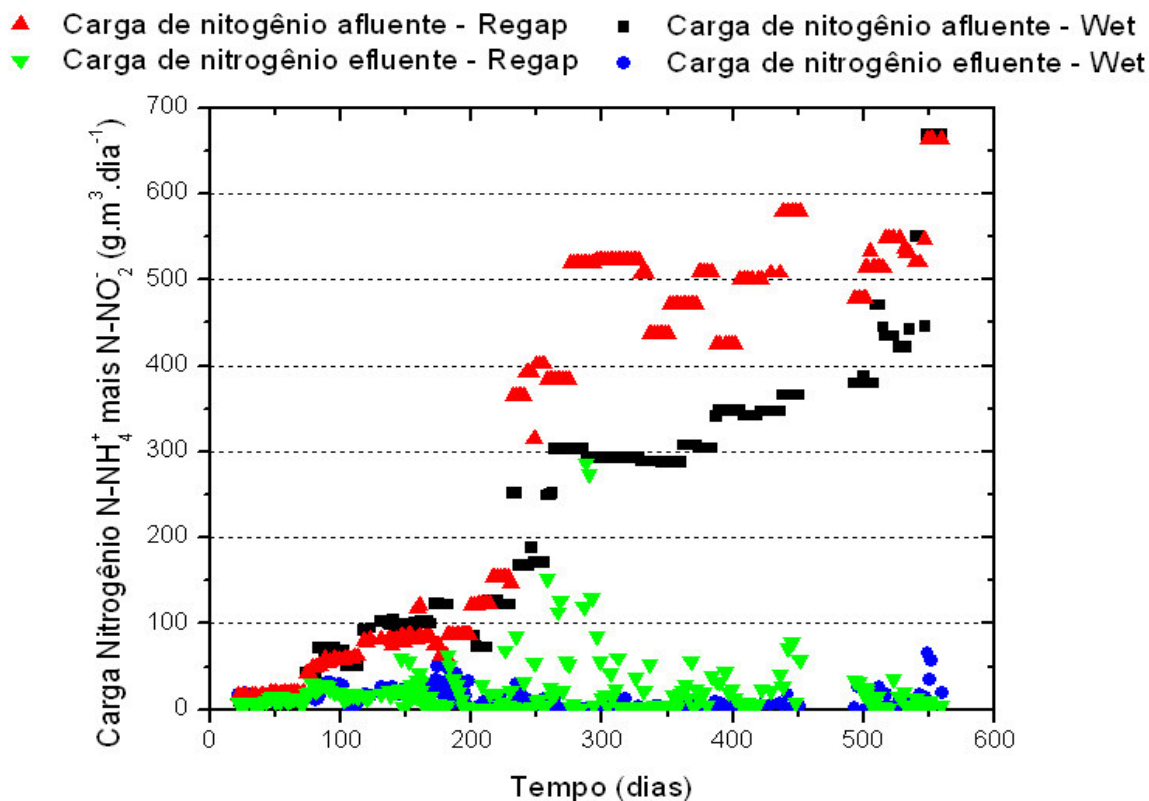
A TDH de 8 horas permitiu RII alcançar remoção de 95% de carga de nitrogênio afluente, em média, de  $500 \text{ g/m}^3\text{d}^{-1}$  após 530 dias de operação .

TSUSHIMA *et al.*, (2007) obtiveram remoção de carga de nitrogênio em torno de  $26000 \text{ g/m}^3$  dia, em reator de leito fixo. Entretanto a carga de nitrogênio aplicada era de  $58.500 \text{ g/m}^3$ , apresentando eficiência de remoção em torno de 60%.

Martins, (2010) obteve em reator de leito fixo, eficiência de remoção em torno de 97% de carga aplicada de  $600 \text{ g N/m}^3$ , semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, para RII.

Na **Figura 5.12** são apresentados os valores das cargas de nitrogênio ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^-$ ) afluente e efluente em RI e RII ao longo dos 550 dias de operação. Observou-se o desempenho mais eficiente de remoção para RII quando comparado a RI.

O RII alcançou média de remoção em torno de 97%, por longo período (360 dias) quando submetido a aplicação de carga de nitrogênio média de  $550 \text{ g/m}^3\text{d}^{-1}$  ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^-$ ), apesar dos picos de inibição apresentados (próximos ao dia 300). Já, RI alcançou média de remoção em torno de 97%, por longo período, porém, a carga de nitrogênio aplicada se manteve em média  $300 \text{ g/m}^3\text{d}^{-1}$  ( $N-NH_4^+ + N-NO_2^-$ ).



**Figura 5.12-** Cargas de nitrogênio ( $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$ ) afluente e efluente nos reatores RI e RII, ao longo de todo o período operacional.

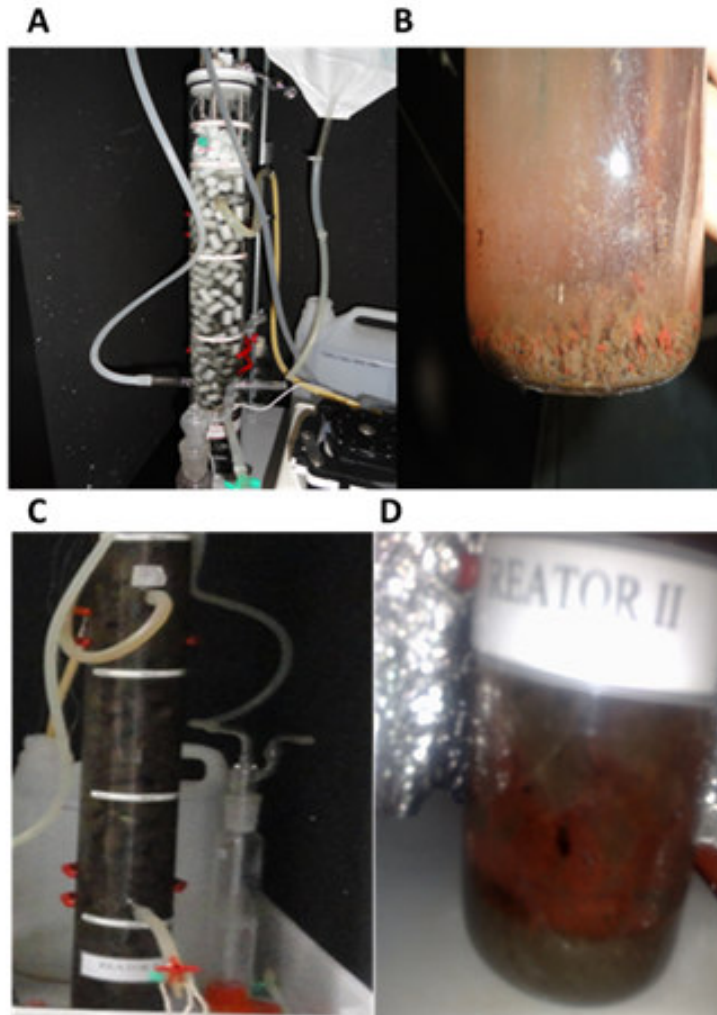
O melhor desempenho na eficiência do processo Anammox em RII quando comparado ao RI, certamente está relacionado a maior concentração de biomassa inoculada (20 g/L SST) em relação a RI (8g/L SST). Campos (2011) realizou experimento em RBS (1,2L) em duas fases: fase-I que apresentou atividade após 90 dias de cultivo e fase II após 50 dias. Tal fato foi atribuído à maior concentração de biomassa inoculada na fase II.

Outra diferença que pode estar relacionada a melhor eficiência de RII é a maior diversidade Anammox encontrada no lodo inoculado, *Ca. Anammoxoglobus*, *Ca. Kuenenia* e *Ca. Brocadia*, o que poderia gerar melhor adaptação da cultura no reator, enquanto RI apresentou apenas um gênero *Ca. Brocadia* (HU *et al*, 2010).

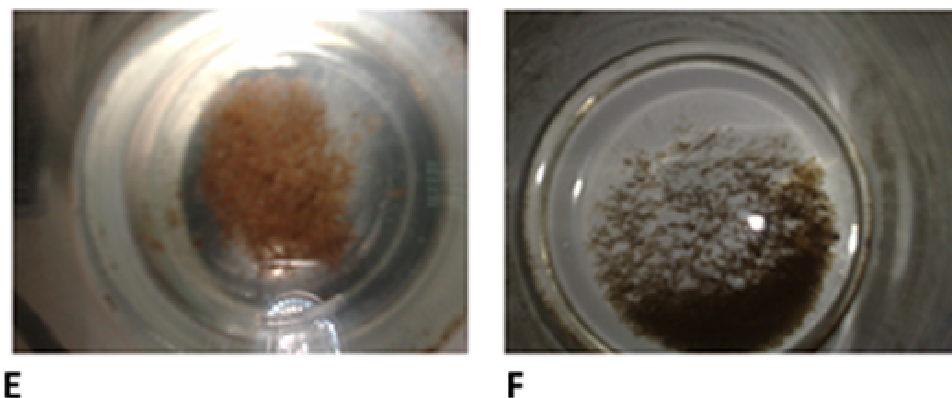
A utilização e sucesso do lodo da REGAP como inóculo do reator Anammox, poderá gerar informações que contribuirão com a adaptação dessas bactérias ao tratamento de efluentes que apresentem altas concentrações de amônia e compostos tóxicos como fenol, óleos e graxas; uma vez que a biomassa inoculada se desenvolvia nesse tipo de ambiente.

#### 5.4.4 – Coloração da Biomassa em RI e RII

No início da operação dos reatores a biomassa apresentava aspecto escuro e encontrava-se no fundo do reator em RI e mais distribuída em RII, o qual apresentava um aspecto muito denso devido à graxa presente no lodo inoculado, **Figura 5.13**. Após 1 ano de operação, foi observada a formação de grânulos de coloração marrom alaranjado em RI, característicos de bactérias Anammox. Tal coloração tem sido atribuída ao ferro associado ao citocromo presente em grande quantidade em culturas Anammox ativas (Jetten *et al.*, 2005). Nesse período (1 ano) a visualização de grânulos alaranjados em RII, (muito escuro) foi conseguida inicialmente por microscopia, e após 410 dias, foi possível visualizar o tom alaranjado no reator.

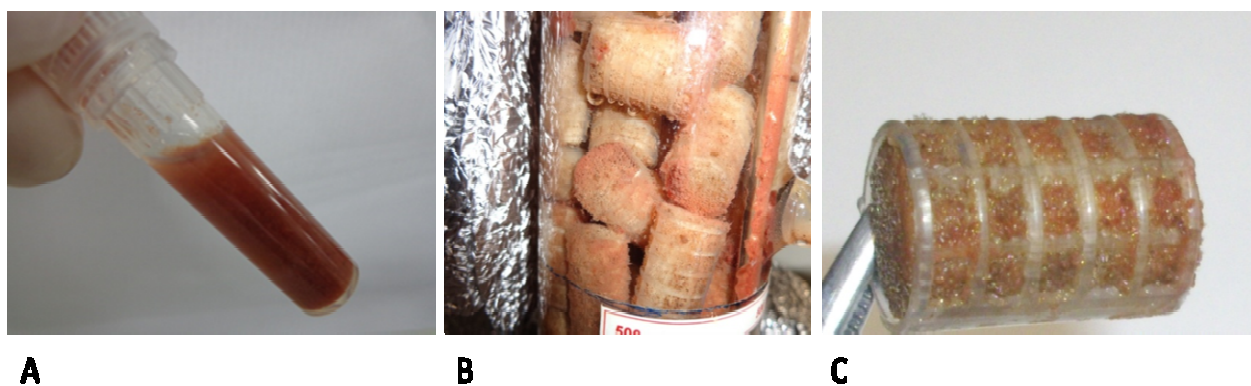






**Figura 5.13** – Visualização da coloração da biomassa nos reatores. (A) início da operação RI; (B) 370 dias de operação com coloração marrom alaranjada e aspecto granulado em RI; (C) início da operação RII (D) RII após 410 dias de operação (E) Grânulos retirados de RI após 1 ano de operação (F) Grânulos retirados de RII após 1 ano de operação.

Após dois anos de operação de RI ficou completamente alaranjado apresentando material suporte colonizado pela biomassa alaranjada **Figura 5.14**.

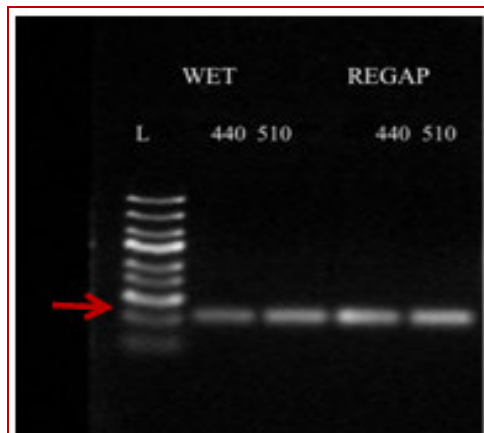


**Figura 5.14** – Visualização da biomassa enriquecida em RI após dois anos de operação: (A) Biomassa coletada em frasco (B) reator com material suporte colonizado por biomassa de cor alaranjada (C) material suporte colonizado.

#### **5.4.5 - Confirmação das bactérias Anammox por PCR utilizando o par de primer HzsA 526f/ HzsA 1857r**

Os resultados da detecção de bactérias Anammox pela PCR utilizando os *primers* que codificam para a subunidade A (*HzsA*) do gene que codifica a enzima hidrazina sintase HzsA 526f/ HzsA 1857r, apresentaram resultados positivos para as amostras analisadas aos 440 e 510 dias de operação, tanto no lodo coletado em RI quanto em RII (**Figura 5.15**). Foi observado que a intensidade da banda referente à amostra de RII (REGAP) apresentou maior

intensidade quando comparado a RI, sugerindo a existência de maior concentração de DNA, e conseqüentemente, de bactérias Anammox nesse lodo, como constatado na análise de *pirosequenciamento*.



**Figura 5.15** – Detecção de bactérias *Anammox* pela PCR com iniciadores para a subunidade *HzsA* da enzima hidrazina sintase de bactérias *Anammox* aos 440 e 510 dias de operação para RI e RII – (*HzsA* 526f/*HzsA* 1857r fragmento de tamanho 1300pb).

O gene da *hidrazina sintase* é considerado o 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 ao gene funcional dos organismos alvo. Sua presença não foi observada em outros microrganismos (HARHANGI *et al.*, 2012).

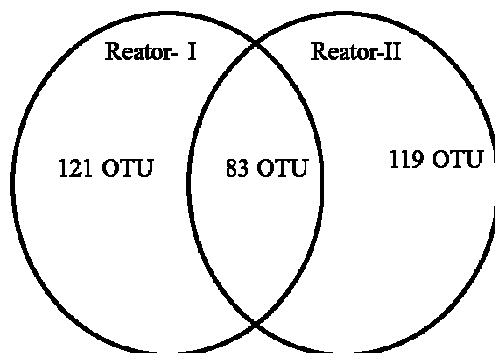
### **5.5 - Análise da diversidade bacteriana desenvolvida nos reatores pela técnica pirosequenciamento**

As amostras de lodo para análise de diversidade microbiana de RI e RII pela técnica de pirosequenciamento foram coletadas após 440 dias de operação.

O pirosequenciamento dessas amostras gerou um total de 3522 seqüências para RI e 4518 seqüências para RII. Após processamento das amostras, restaram 3397 e 4421 seqüências para RI e RII, respectivamente, apresentando, em média, tamanho de 230pb.

Foram definidas 329 UTOs para RI e 299 UTOs para RII, adotando o nível de similaridade 97% . Para as análises taxonômicas foram removidas as UTOs únicas, resultando em um total de 204 UTOs para RI e 202 UTOs pra RII.

A **Figura 5.16** apresenta o número de UTOS comuns e exclusivas a cada reator. Observa-se que 25,7% das 323 UTOS analisadas foram comuns aos dois reatores e 37,46 % foram exclusivas para RI e 36,84% exclusivas no RII. Entre as UTOS comuns, 6% foram UTOS pertencentes ao grupo *Anammox*.



**Figura 5.16:** Diagrama representando UTOS comuns e exclusivas para cada reator. O número de UTOS únicas para cada reator está indicada dentro de cada círculo, enquanto que os números de UTOS comuns aos dois reatores estão indicados na região sobreposta. As UTOS foram definidas considerando 97% de similaridade nas sequências.

A abundância relativa da amostra do R-I foi de 78,63% e 73,22% para RII, significando que muitas sequências analisadas foram comuns às duas amostras. Isso implica que 78,63% das sequências obtidas fazem parte das UTOS comuns às duas amostras analisadas. Logo, 21,37% das sequências foram exclusivas para RI e 26,78% das sequências exclusivas para RII. Apesar das amostras de RI e RII apresentarem diferença de diversidade bacteriana, pode-se observar que os grupos de maior abundância reativa, foram em sua maioria, comuns.

### 5.5.1 - Índices de diversidade

A diferença de diversidade, variedade e abundância do reator foi demonstrada nos cálculos dos índices de diversidade, **Tabela 5.7**.

**Tabela 5.7:** Resumo de informações obtidas na análise de pirosequenciamento das amostras coletadas em RI e RII após 440 dias de operação.

	R-Wetland	R-REGAP
Cobertura estimada (%)	96,45	97,25
Total de <i>sequências</i>	3522	4518
OTUs observadas	329	299
Chao1	446,4±56	404,8±63
Shannon (H)	4.26±0.11	4.23±0.13
Simpson (1-D)	0.96	0.97
Dominância	0,04	0,03
Equitabilidade	0,74±0,02	0,74±0,01
OTUs únicas	125	97
Jaccard		0,24
Bray & Curtis		0,45
Total de UTOs analisadas	204	202
Total de <i>sequências</i> analisadas	3397	4421

**Equitabilidade/dominância** é o termo empregado para definir a uniformidade, ou homogeneidade, da distribuição de abundância de espécies em uma comunidade. Reflete o grau de dominância de espécies em uma comunidade. Geralmente é expressa de forma numérica (variando de zero a um).

Quanto mais próximas as abundâncias das espécies dentro de uma comunidade, maior a equitabilidade e menor a dominância. O índice de equitabilidade com valores altos, em torno de 0,74, como encontrado nos dois reatores, reflete maior variação da diversidade microbiana em RI e RII, e é confirmado pelos baixos valores encontrados para dominância, 0,036 em ambos reatores, apresentando distribuição equânime dos táxons na comunidade bacteriana (valores próximos de 0 indicam a presença equânime dos táxons e valores próximos de 1 indicam o domínio de um táxon na comunidade).

**Índice de Chao1:** Corrige o número de UTOs observadas por um fator baseado em UTOs raras. Varia de 0 a  $\infty$  (infinito). Valores maiores como encontrados tanto em RI como RII indicam maior diversidade.

**Índice de Simpson:** O índice de Simpson é baseado na proporção entre os indivíduos. Geralmente é demonstrado sobre a forma 1-D. Quanto mais próximo de 1, maior a diversidade, quanto mais próximo de 0, menor a diversidade. Indica a probabilidade de dois membros da comunidade retirados aleatoriamente pertencerem ao mesmo grupo. É fortemente influenciado pela uniformidade. O valor calculado ficou próximo de 0,96 para os dois reatores, indicando, alta diversidade em ambos os reatores.

**Índice Shannon (H')**: Caracteriza uma comunidade que considera a riqueza das espécies e sua abundância relativa. Fortemente influenciado pela riqueza e uniformidade, varia de 0 a 5. Quanto maior o índice, maior o número de táxon na comunidade. Valores obtidos próximos a 5, como 4,26 para RI e 4,23 para RII, indicam alta diversidade.

As diferenças na composição, em nível de filo, se mantiveram quando os índices Jaccard e Bray Curtis foram calculados para estimar a similaridade entre as duas amostras 0,24 e 0,45, respectivamente. Mas os filios mais abundantes foram comuns.

Considerando-se que a configuração dos reatores foram idênticas, e que as condições de operação foram semelhantes, é possível inferir que a fonte de inóculo e a carga de nitrogênio aplicada em cada reactor produziu um efeito importante na seleção das comunidades bacterianas desenvolvidas nos reatores.

### 5.5.2 - Caracterização da diversidade bacteriana nos reatores

Na análise de pirosequenciamento várias categorias taxonômicas podem ser avaliadas, porém, a medida que se aprofunda na classificação, o número de sequências/UTOs classificadas fica reduzido. Nesse trabalho, foi observado um rendimento de 96% de UTOs analisadas em nível de filo para RI e RII. Entretanto, para a categoria gênero, esse rendimento foi reduzido para 22% (**Tabela 5.8**). Portanto, optou-se por restringir a análise detalhada das amostras para as categorias taxonômicas filo e gênero.

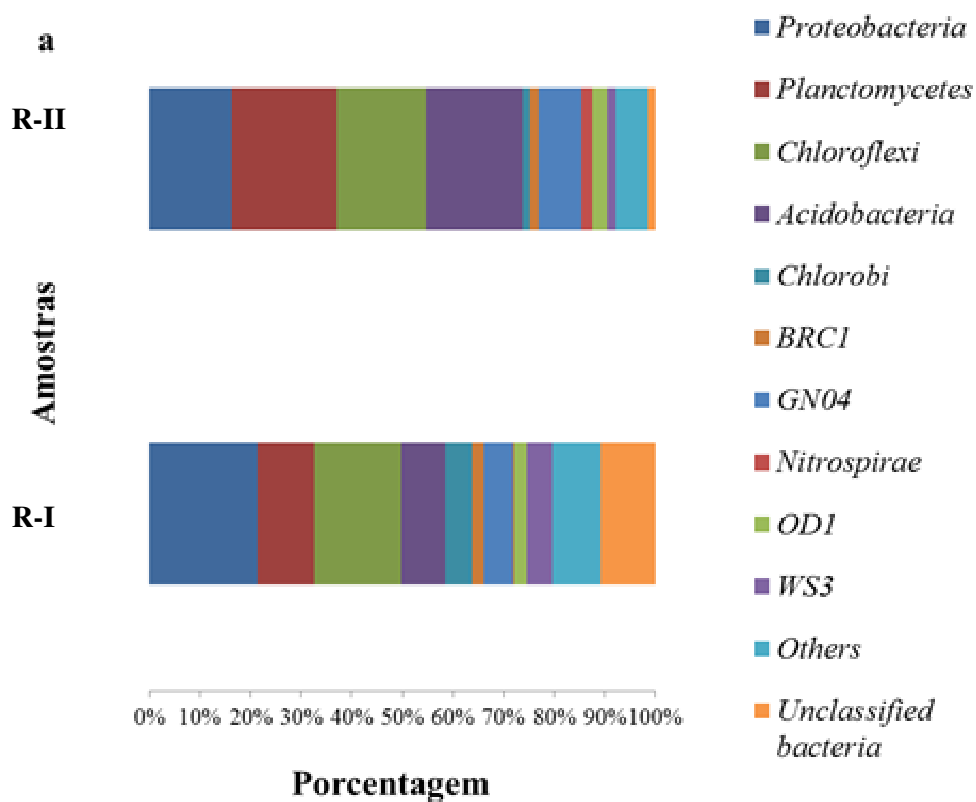
**Tabela 5.8** – Abundância relativa e número de UTOs não classificados em diferentes níveis taxonômicos revelados por análise de *pirosequenciamento* (97% de similaridade)

	Abundância relativa		Número de UTOs	
	Reator I ( <i>Wetland</i> )	Reator II ( REGAP)	Reator I ( <i>Wetland</i> )	Reator II ( REGAP)
<b>Filo</b>	10,89%	1,38%	7	7
<b>Classe</b>	13,84%	1,97%	16	10
<b>Ordem</b>	36,59%	36,62%	68	66
<b>Família</b>	59,61%	64,69%	112	115
<b>Gênero</b>	76,33%	74,58%	160	158

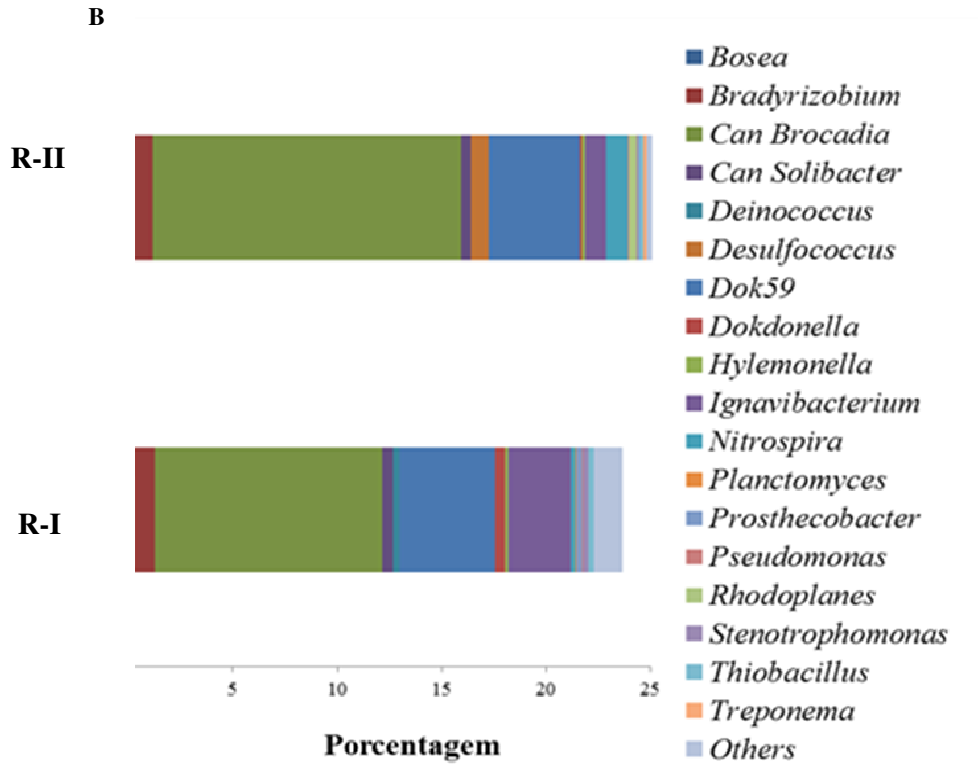
### 5.5.2.1 Filos

Embora os reatores tenham sido operados em condições voltadas para o enriquecimento das bactérias Anammox, por mais de 500 dias, uma proporção elevada da população bacteriana desenvolvida não pertencia ao grupo das bactérias Anammox.

Os principais filos observados nas análises de pirosequenciamento das amostras obtidas de RI foram: *Acidobactéria* (8,83), *Proteobactéria* (21,37%), *Chloroflexi* (17%), *Planctomycetes* (11%), GNO4 (5,6%), e *Chlorobi* (5%) e em RII foram *Planctomycetes* (21%), *Acidobacteria* (19%), *Chloroflexi* (17,6) *Proteobacteria* (16%) e *GNO4* (8,5%) ( **Figura 5.17** e **Figura 5.18** ).



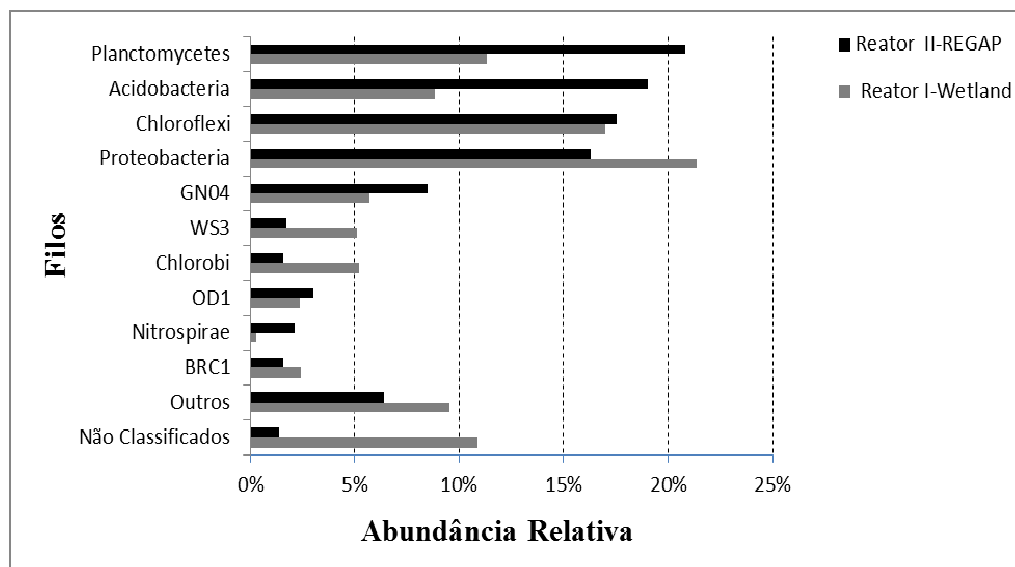
**Figura.5.17** - Composição da comunidade bacteriana revelada por pirosequenciamento em nível de filo(a) das amostras coletadas nos reatores I e II. A abundância está apresentada em porcentagem de diferentes filos.



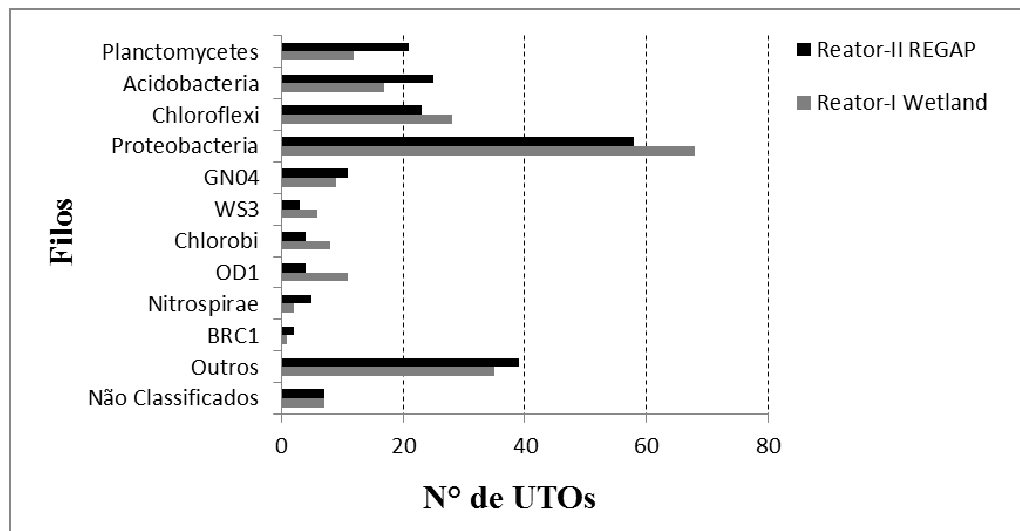
**Figura.5.18** - Composição da comunidade bacteriana revelada por pirosequenciamento em nível de gênero das amostras coletadas nos reatores I e II. A abundância está apresentada em porcentagem de diferentes gêneros recuperados nas amostras.

O filo *Proteobacteria* foi mais abundante em RI (21,4%) enquanto que *Planctomycetes* foi o mais abundante em RII (20,80%). (Figura 5.19.a e Figura 5.19.a)

A



B



**Figura 5.19:** Abundância relativa (A) e número de UTOS analisadas (B) dos dez filios mais representativos (similaridade 97%) da biomassa coletada em RI e RII após 440 dias operação.

O filo *Proteobacteria* é o maior e mais diverso grupo dentro do domínio *Bacteria*. Constituem a maioria das bactérias conhecidas de importância médica, industrial e agrícola. Todos os microrganismos presentes nesse grupo são gram-negativos e exibem uma diversidade ampla



de mecanismos de obtenção 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 pendunculadas. O filo *Proteobacteria* dividi-se em seis classes, *Alphaproteobactéria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* e *Zetaproteobactéria*. Porém, frequentemente as diferentes classes apresentam características fisiológicas comuns. 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 nos reatores. (MADIGAN *et al.*, 2010).

Em relação à comunidade de *Planctomycetes* desenvolvidas nos reatores foram detectadas as classes Phycisphaerae (5,64) e Planctomycetia (0,12%). O filo *Planctomycetes* foi abundante na biomassa dos dois reatores RI (11,%) e RII (21%). Nesse filo estão inseridas as bactérias Anammox, foco desse estudo. 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. Além disso, são ubíquos e já foram encontrados em 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 *Planctomycetes* nas amostras analisadas era esperada, uma vez que o experimento objetivou principalmente o enriquecimento de bactérias Anammox, pertencentes a esse filo, portanto foram fornecidas condições ideais (pH, temperatura, substratos para o crescimento, condições de anaerobiose) para o crescimento dessas bactérias.

Martins (2010), estudando a diversidade de microrganismos no 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 dos filo *Proteobacteria*, *Chlorobi*, *Nitrospira* *Chloroflexi* coexistindo com membros dos *Planctomycetes*. Esses filos também foram detectados no presente trabalho. Isso sugere que a presença de outros grupos de microrganismos é importante para o desenvolvimento e manutenção das bactérias Anammox no reator, possivelmente devido a simbiose entre esses organismos. HU *et al* (2010) relataram que a utilização de uma fonte de inóculo que contenha várias espécies de Anammox pode aumentar a capacidade de adaptação do inóculo a

novos parâmetros operacionais, possivelmente devido a essa simbiose.

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). Para as amostras de RII, inoculado com lodo oriundo da REGAP, seria importante a presença de organismos degradadores de compostos aromáticos como *Pseudomonas sp.* do filo *Proteobacteria*.

Membros do filo *Acidobacteria* foram detectados em ambos os reatores, porém com maior abundância relativa no reator II (19,0%) em relação ao reator I (8,8%) . Como o Reator II foi inoculado com lodo obtido de estação de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo, onde foram relatados a presença de fenóis (11,8 mg L<sup>-1</sup>) , óleos e graxas (10 mg L<sup>-1</sup>), além de outros hidrocarbonetos complexos, justifica a abundância desse grupo que previamente foram encontrados em ambientes expostos a compostos de fenol. Esses organismos são bactérias heterotróficas capazes de utilizar para obtenção de energia desde hidrocarbonetos simples aos substratos mais complexos (WARD *et al.*, 2009), bastante disponíveis na ETE de refinaria de petróleo. *Solibacter*, um membro deste filo, foi relatado anteriormente em reator Anammox, mas com abundância relativa baixa (2,0%) (CHO *et al.*, 2010).

Pereira (2013), estudando o efeito de fenol em um reator Anammox, operado em batelada sequencial (RBS), inoculado com lodo ativado proveniente do sistema de tratamento de esgoto sanitário ETE-Arrudas, detectou, por pirosequenciamento, abundância relativa muito menor de *Acidobactéria* (2,9%) em comparação àquelas relatadas no presente estudo (9% - RI e 19% - RII). 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%). Membros do *Acidobacteria* apresentaram abundância relativa muito menor (2,2%) quando comparado a amostras de RI (8,7%), talvez por terem origem distintas. Possivelmente essa diferença seja atribuída ao tipo de sistema onde cada inóculo foi coletado, lodos ativados para RBS e *Wetland* construída pra RI, ou ainda a idade do reator, ou mesmo a configuração do reator utilizado (Kartal *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2010a).

O filo *Acidobacteria* tem sido identificado através de análises filogenéticas dos genes de RNAr 16S. Sequências desse grupo têm sido isoladas numa variedade de ambientes, incluindo

solos, sedimentos, fontes termais, neve, marinho, fezes, ambientes de caverna, solos contaminados com metais. Análises de novos isolados auxiliarão na compreensão de vários papéis funcionais desempenhados pelos membros deste filo.

Silva *et al*, (2012), utilizou a análise de pirosequenciamento para avaliar a diversidade filogenética em um reator destinado ao enriquecimento de microrganismos degradadores de fenol, inoculado com lodo oriundo da planta de tratamento de efluente da REGAP, mesma planta de tratamento avaliada no presente estudo. A análise filogenética mostrou que a maioria das sequências foi afiliada ao domínio das bactérias (64%) e as sequências restantes foram distribuídas entre os domínios Archaea e Eucariota.

Entre os filios de bactérias avaliados, os mais abundantes foram *Proteobacteria* (66%), seguido de *Bacteroidetes* (7%), *Actinobacterias* (5,5%), *Planctomycetes* (4,9%) e *Verrucomicrobia* (1,3%). Portanto, *Proteobacteria* é um filo importante nesse ecossistema, e desempenha papel fundamental em processos de biodegradação que ocorrem em sistemas de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo. Esses resultados são semelhantes aos obtidos nesse estudo, onde a abundância relativa do filo *Proteobacteria* (16,31) foi bem superior àquela encontrada na amostras enriquecidas a partir do lodo oriundo de esgoto sanitário (8,8%). Porém, contrasta em relação a abundância relativa obtida para outros filios encontrados, como a predominância de *Acidobacteria*, com abundância relativa de 19%. Isso sugere a possibilidade de seleção de microrganismos importantes na ecologia da comunidade favorecida (Anammox ou degradadoras de fenol), dependente do tipo de enriquecimento desejado, além dos substratos e condições operacionais fornecidos. Outro resultado interessante se refere à abundância relativa do filo *Planctomycetes* (4,9%) do trabalho realizado por Silva *et al*, (2012), em relação ao estudo presente, que detectou aproximadamente 21%, indicando que alta abundância não estaria presente no inóculo e se deve ao processo de enriquecimento de bactérias Anammox, membro dos *Planctomycetes*. E que, provavelmente, a predominância de *Acidobactérias* esteja relacionada ao sucesso do enriquecimento Anammox.

O filo *Chloroflexi* foi amplamente distribuído nos dois reatores (aproximadamente 17%). O Manual Bergeys de Sistemática Bacteriológica considera o nome *Chloroflexi* em substituição ao nome “Bactérias verdes não sulfurosas”. Fisiologicamente esse filo, assim como as bactérias púrpuras não sulfurosas, é capaz de crescer em fotoautotrofia, também apresenta

bom crescimento quimiorganotrófico na ausência de luz, realizando respiração aeróbia, mas podem apresentar metabolismo anaeróbio. A maioria dos membros deste filo são descritos como bactérias filamentosas. Possuem representantes termofílicos (MADIGAN *et al.*, 2010). Esse grupo tem passado por uma expansão significativa devido a adição de várias sequências de DNA obtidas em amostras ambientais. Várias dessas amostras ambientais são oriundas de habitats contaminados com poluentes (BJORNSSON *et al.*, 2002). Outras sequências têm sido obtidas em ambientes aquáticos: marinho, águas termais e sedimentos de lagos e rios (BJORNSSON *et al.*, 2002). Também, tem sido reportados em reatores anaeróbios em estações de tratamento de esgotos em reatores UASB (KRAGELUND *et al.*, 2011). *Chloroflexi* é considerado um filo bastante frequente em reatores Anammox que obtiveram sucesso no enriquecimento e a alta frequência de sua detecção sugere a importância do filo para a granulação da biomassa existente nos reatores. (CHO *et al.*, 2010, LI *et al.*, 2009, HU *et al.* 2012, XIAO *et al.*, 2009).

Foi relatada sua distribuição na superfície dos grânulos e próximas às Anammox (CHO *et al.*, 2010) o que vem a corroborar hipótese de que esses microrganismos contribuem para o estabelecimento de um ambiente anaeróbio e poderia viver em simbiose com as Anammox (Zhang *et al.*, 2012).

O papel exato dos *Chloroflexi* em sistemas de tratamento de águas residuárias ainda não está estabelecido, mas alguns pesquisadores sugerem que eles poderiam degradar e utilizar macromoléculas derivadas de decomposição da biomassa e reforçar a estrutura dos grânulos como uma rede de biomassa filamentosa (LI, *et al.*, 2010).

#### **GN04**

Encontrados na proporção de 5,7% (reator I) e 8,5% (em reator II), GN04 ainda é um candidato a filo, já que não possui membros que tenham sido isolados. Informações morfológicas e fisiológicas sobre eles são escassas, no entanto, as sequências associadas a esse filo foram recuperados a partir de amostras ambientais (<http://www.uniprot.org/taxonomy/363473>).

### **Chlorobi**

Membros pertencentes a esse filo representaram 5,2% RI e 1,6% em RII. Foram previamente reportados em outros reatores Anammox mas em maior proporção (STROUS *et al.*, 2006, LI *et al.*, 2009), sugerindo que eles possam desempenhar papel importante no ecossistema. Ignavibacterium um membro deste filo foi detectado no nível de gênero.

Outros filios menos abundantes foram: WS3, OD1, BRC1 e *Nitrospirae*. Estes apresentaram abundância relativa entre 2 a 8% variando entre os dois reatores.

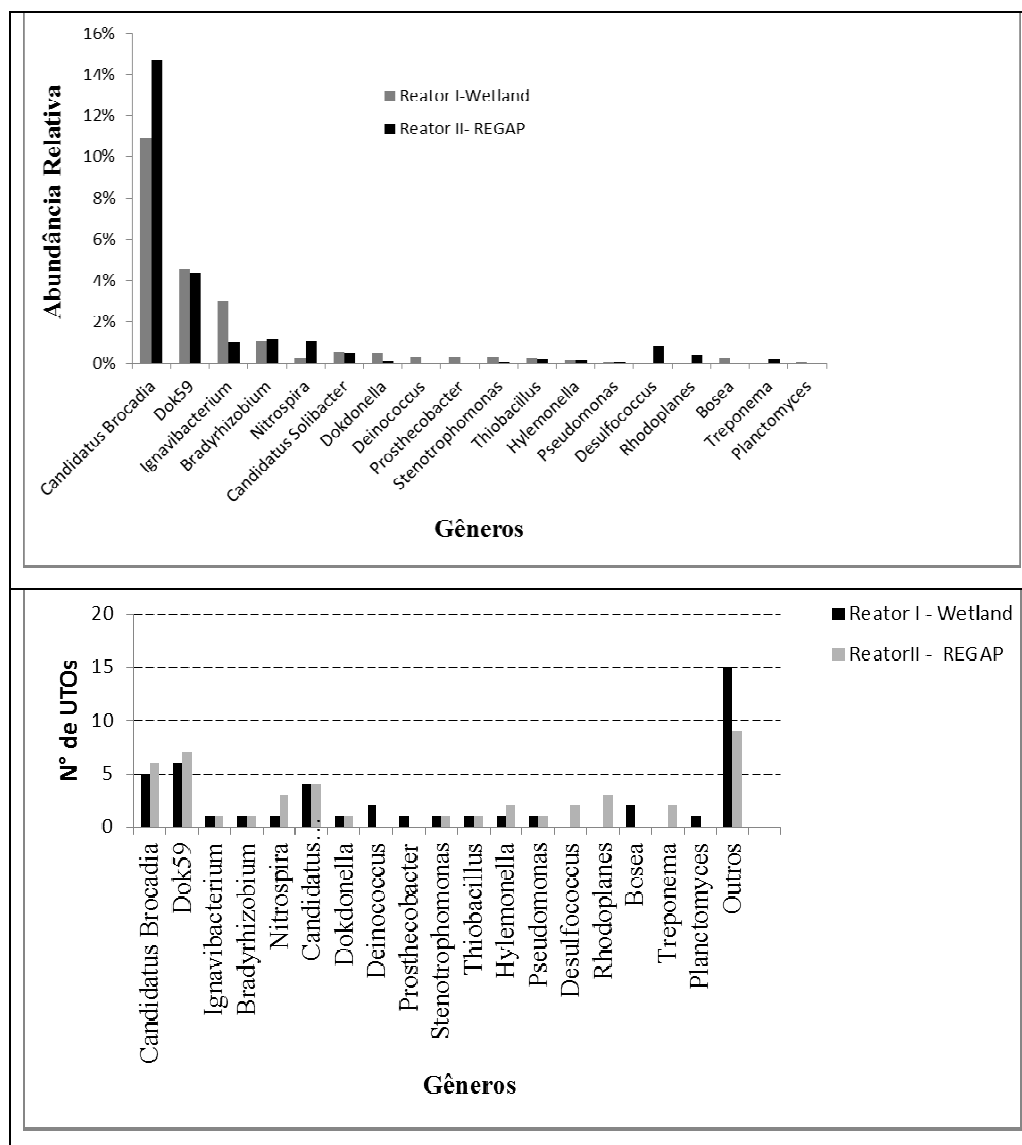
#### **5.5.2.2 Gêneros**

A abundância relativa dos gêneros classificados em RI foi de 24,44% para RI e 25% para RII. Do total de 204 UTOs analisadas em RI apenas 44 foram classificadas até o nível de gênero e de 202 UTOs analisadas em RII apenas 44 foram identificadas em nível de gênero. Na **Figura 5.20** são apresentados os gêneros mais representativos das amostras. Como era previsto, houve a predominância absoluta do gênero, *Candidatus Brocadia* (abundância relativa de 10,89% em RI e 14,73% em RII), responsável pelo processo Anammox, uma vez que o reator foi submetido às condições necessárias ao enriquecimento das bactérias Anammox.

### **Bactérias nitrificantes**

Apesar da elevada cobertura das novas tecnologias de sequenciamento utilizada nesse estudo, não foram detectadas bactérias aeróbias oxidadoras de amônia. Entretanto, sequências de *Nitrospirae*, filo ao qual pertencem algumas bactérias oxidadoras de nitrito, foram detectadas com abundância relativa de 0,26% em RI e 2,10% em RII. Em nível de gênero, foram detectados representantes de *Nitrospira* com abundância relativa de 0,21% em RI e 1% em RII. Embora o gênero *Nitrospira* tenha sido encontrado inicialmente em ambientes marinhos, vários estudos detectaram o gênero em outros ambientes (aquários de água doce, reatores de leite fluidizado, biofilmes removendo fósforo e lodos ativados), como também foi observado que esse gênero de NOB era o que predominava (DAIMS *et al.*, 2001).

A presença de *Nitrospira* em reatores Anammox foi relatada anteriormente (EGLI *et al.*, 2001). Acredita-se que estes organismos possam favorecer as bactérias Anammox através da remoção do oxigênio dissolvido no meio, bem como consumir o excesso de nitrito presente no reator e poderia inibir o processo Anammox.



**Figura 5.20:** Abundância relativa (A) e número de UTOs analisadas (B) dos gêneros mais representativos (similaridade 97%) da biomassa coletada em RI e RII após 440 dias operação.

Os gêneros *Bosea*, *Deinococcus*, *Planctomyces*, *Prostheco bacter* estiveram presentes em RI e ausentes em RII, por outro lado os gêneros *Desulfococcus*, *Rhodoplanes* e *Treponema* estiveram presentes em RII e ausentes em RI.

*Desulfococcus* utiliza vários compostos aromáticos como fontes de carbono e energia celular. Assim, a presença desse gênero apenas em RII pode está relacionado, principalmente à origem do lodo de inóculo proveniente da ETE da REGAP.

**Bactérias desnitrificantes**

A presença de vários gêneros com capacidades de desnitrificação conhecidos foram detectados em ambos os reatores, são eles: *dok59*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* e *Rhodoplanes* (exclusivamente detectado em RII). A abundância relativa desses gêneros foi de 5,9% RI e 6,2% para RII. Com uma alta predominância de dok 59 e *Bradyrhizobium*. O dok59 compreende bactérias que pertenciam a família *Rhodocyclaceae*. Muitos membros desta família são comuns e abundantes em estações de tratamento de efluentes e apresentam uma versatilidade metabólica benéfica para a degradação e transformação de poluentes, como o compostos nitrogenados (desnitrificação), compostos de fósforo e aromáticos (ETCHEBEHERE *et al.*, 2003). A abundância relativa reduzida das bactérias desnitrificantes em ambos os reatores indicou que a maior parte do nitrito foi consumida pelas bactérias Anammox. Fato que está de acordo com os resultados obtidos da avaliação do desempenho dos reatores, tendo o processo ANAMMOX como o principal fonte de remoção de N-amoniaco dos mesmos. No entanto, a coexistência de bactérias Anammox, desnitrificantes e nitrificantes ocorreu no presente estudo e também foi relatado antes (XIAO *et al.*, 2009).

**5.6 - Organismos Anammox detectados por pirosequenciamento.**

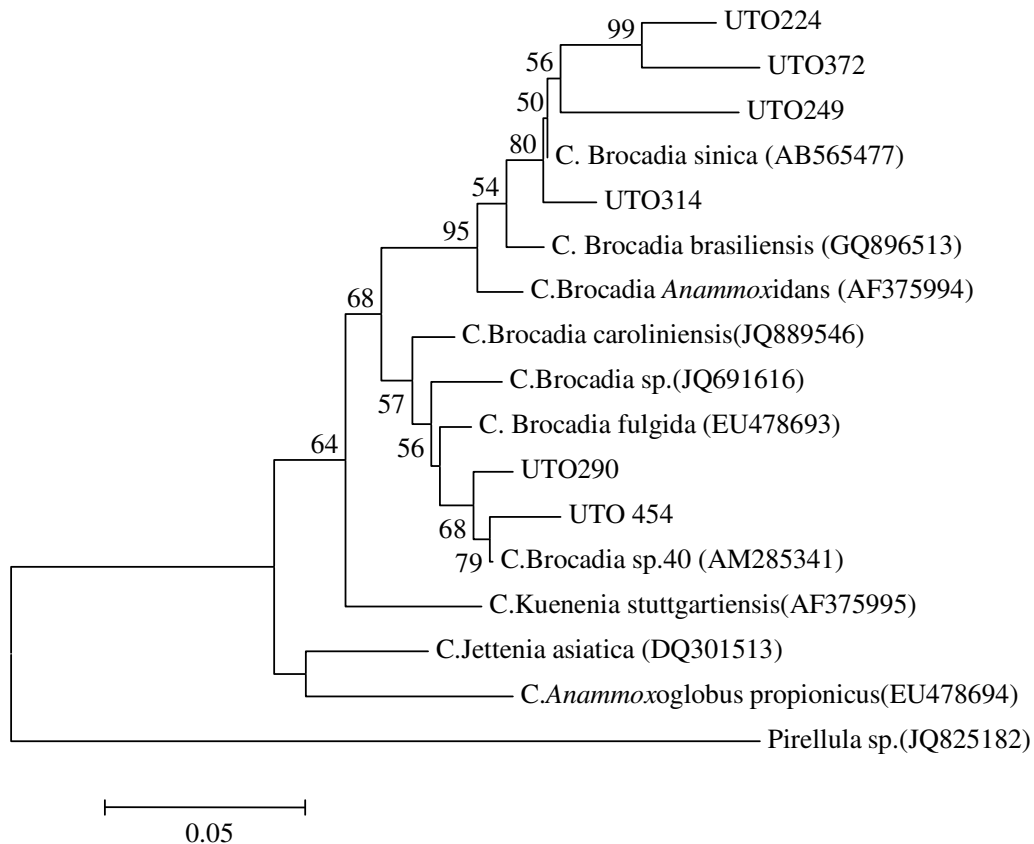
Em relação à comunidade de Planctomycetes desenvolvidas nos reatores foram detectadas as classes Phycisphaerae (5,64) e Planctomycetia (0,12%).

Em nível de gênero de bactérias Anammox, apenas *Ca. Brocadia* esteve presente nos dois reatores, sendo 10,9% para RI e 14,7% para Reator RII. Esses resultados confirmam que somente o gênero *Ca Brocadia* foi enriquecido nos dois reatores e seriam responsáveis pelo alto percentual de remoção de nitrogênio (N-  $\text{NH}_4^+$  e N-  $\text{NO}_2^-$ ) obtido durante o período de operação e monitoramento dos mesmos.

As leituras obtidas para o gênero *Ca Brocadia* corresponderam a 96,4 e 70,7% do total dos Planctomycetes para R-I e R-II, respectivamente. Entretanto, aproximadamente 30% do total de Planctomycetes não foram classificados em R-II para as categorias taxonômicas mais específicas, sugerindo que outros grupos de Anammox (desconhecidos) poderiam estar presentes.

A abundância relativa e diversidade de UTOs relacionadas aos organismos Anammox foi maior nas amostras obtidas no RII -REGAP quando comparado ao RI-*Wetland*. Como o R-II foi submetido a aplicação de maior carga de nitrogênio, podemos inferir que esse fator poderia favorecer maior abundância relativa de Anammox.

De todas as UTOs obtidas nos dois reatores 6 foram relacionadas às bactérias Anammox, todas pertencentes a um único gênero, *Ca. Brocadia*. Dentre as 6 UTOs (224, 249, 290, 314, 372 e 454), 5 UTOs foram comuns aos dois reatores e somente a UTO 249 foi detectada apenas no RII. Para avaliar a relação filogenética entre essas UTOs foi construída uma árvore filogenética incluindo as sequências das diferentes espécies descritas pertencentes ao gênero *Ca. Brocadia*, **Figura 5.21**.



**Figura 5.21** – Árvore filogenética mostrando a posição das UTOs relacionadas às bactérias Anammox obtidas pela análise de *pirosequenciamento* das amostras coletadas nos reatores RI (*wetland*) e RII (REGAP) após 440 dias de operação. A barra de escala representa uma divergência de 5% na sequência. *Pirellula sp.* foi utilizado como *outgroup*. Os números dos nós da árvore representam 1000 análises de *Bootstrap*. Os números de acesso das sequências depositadas no *GenBank* se encontram entre parênteses.



As UTOs que apresentaram maior predominância em ambos os reatores foram: 314, 454 e 224. Onde, as UTOs 314 e 454 foram relacionadas às sequências de *Ca. Brocadia sinica* e *Ca. Brocadia sp.40*, respectivamente, depositadas no BLAST.

O número de sequências encontradas em cada UTO relacionada ao gênero *C. Brocadia* presente nas amostras analisadas se encontra na **Tabela 5.9**.

**Tabela 5.9-** Número de sequências encontradas em cada UTO relacionadas ao gênero *C. Brocadia* presente nas amostras de reatores I e II analisadas por *pirosequenciamento*.

UTO	Nº de sequências representativas de <i>C. Brocadia</i> no RI-Wetland	Nº de sequências representativas de <i>C. Brocadia</i> no RII-REGAP
224	41	70
249	0	4
290	12	11
314	260	429
372	2	2
454	55	135

A UTO 224 não foi intimamente relacionada a qualquer espécie de Anammox apresentada, podendo corresponder a uma nova espécie, porém outros estudos, (clonagem, por exemplo), devem ser realizados para confirmar essa hipótese, uma vez que as sequências selecionadas nessa reação de pirosequenciamento possuem fragmento de tamanho muito pequeno (230pb aproximadamente) para indicar uma nova espécie. Estes resultados indicam, que pelo menos, duas populações dominaram a comunidade Anammox em cada um dos dois reatores. Assim, estes resultados estão em contraste HU *et al* (2010) que observaram apenas uma população de Anammox que dominou a comunidade em cada um dos oito reatores pesquisados.

A diversidade dos organismos Anammox encontrada nos reatores após 440 dias de operação diferiu da análise da diversidade das bactérias Anammox encontradas nos lodos de inóculo dos reatores I e II. A análise das sequências obtidas pela clonagem dos inóculos detectou a presença exclusiva do gênero *Ca. Brocadia* no lodo Wetland (inoculado em RI), e de três gêneros de Anammox: *Ca. Brocadia*, *Ca. Kuenenia* e *Ca. Anammoxoglobus* no lodo obtido na REGAP, inoculado em RII. Portanto, os resultados sugerem que, apesar das diferenças observadas na composição de Anammox dos inóculos, as condições operacionais semelhantes aplicadas aos reatores selecionaram um único gênero de Anammox, *Ca. Brocadia*. Estes resultados estão em contraste com os resultados apresentados por Date *et al.*, 2009; onde os

autores concluíram que a espécie de Anammox predominante na cultura enriquecida depende do inóculo utilizado; ou seja, diferentes inóculos resultaram em populações distintas de Anammox em reatores operados de forma semelhante.

Considerando que a configuração dos reatores foi idêntica, e que as condições operacionais foram similares, é possível inferir que a origem e quantidade do inóculo produzem um efeito importante sobre a composição da comunidade bacteriana total, mas as condições operacionais aplicadas tiveram papel importante na seleção da comunidade Anammox.

Outro aspecto importante avaliado nesse trabalho foi o enriquecimento da cultura Anammox a partir do lodo coletado no sistema de *wetland* construído da planta de tratamento de esgoto sanitário demonstrando que a reação Anammox pode fazer parte do processo de remoção de amônia desses sistemas.

### **5.7 – Comparação de resultados obtidos na análise da diversidade bacteriana encontrada em reatores Anammox**

A diversidade bacteriana em reatores Anammox foi pesquisada anteriormente, pela análise do RNAr 16S através de clonagem, DGGE e /ou PCR em tempo real (PCRq) (CHO *et al.*, 2010, PARK *et al.*, 2010). No entanto, poucos estudos investigaram a diversidade bacteriana em reatores Anammox por pirosequenciamento. As tecnologias de sequenciamento de segunda geração (como o pirosequenciamento-454) fornece informações mais completa sobre as comunidades microbianas devido à alta cobertura em comparação com os métodos tradicionais baseados no sequenciamento Sanger. O Pirosequenciamento ofereceu a capacidade de detectar organismos em baixa abundância, anteriormente não detectáveis pelo limite de detecção da técnica.

Em diferentes reatores Anammox, os filos mais frequentemente detectados co- existindo com *Planctomycetes* são: *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi* e *Nitrospira* sendo os dois primeiros os mais abundantes. Dos filos frequentemente descrito nos bioreatores Anammox, não foram detectados membros do filo *Bacteriodetes* em nenhum dos reatores do presente trabalho, mas outros dois filos foram detectados: *Acidobacteria* e *GN04*. Estes ainda não descritos de forma representativa nestes tipos de bioreatores, sugerindo participação importante na ecologia microbiana para o enriquecimento das bactérias Anammox e estabilidade dos reatores.

Estes resultados indicam que bactérias Anammox e outras bactérias heterotróficas coexistiram em ambos os reatores, suportando a idéia de que uma comunidade microbiana diversificada é útil e, provavelmente, necessária para o enriquecimento das bactérias Anammox e estabilidade do processo Anammox (CHO *et al.*, 2010). Embora na maioria dos estudos Anammox o meio afluente não contenha matéria orgânica, as bactérias heterotróficas dominaram sobre as Anammox. Isso também foi relatado em um reator de nitrificação, em que as bactérias heterotróficas foram dominantes e em maior proporção que as bactérias autotróficas (YE *et al.*, 2011). O fornecimento da matéria orgânica para essas bactérias heterotróficas provavelmente advem do decaimento da biomassa existente no reator. Bactérias oxidadoras de amônia (AOB) do grupo das  $\beta$  - *Proteobacteria* foram observadas co-existindo com bactérias Anammox (HU *et al.*, 2012), sugerindo que a cooperação entre estes grupos pode ser importante para a remoção de amônia, em diferentes tipos de reatores. Apesar da alta cobertura da técnica aplicada no presente estudo, o grupo das AOB não foi detectado, no entanto, observou-se bactérias oxidantes de nitrito do gênero *Nitrospira*. Os filos *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* e *Planctomycetes* também foram predominantes e detectado em outros tipos de lodo oriundos de plantas de tratamento de águas residuárias municipais. Como os *Bacteroidetes* não foram detectados no presente estudo, verificou-se que a composição da biomassa enriquecida em RI e RII não foi semelhante aos outros lodos de plantas de tratamento de águas residuárias municipais.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES

Os resultados do monitoramento dos reatores RI e RII mostraram que foi possível desenvolver atividade e biomassa Anammox a partir dos inóculos selecionados pela detecção prévia das bactérias Anammox.

Observou-se o desempenho mais eficiente de remoção de nitrogênio amoniacal para RII, inoculado com lodo da ETE-REGAP a qual trata concentrações de amônia mais elevadas quando comparadas às ETEs de esgoto doméstico, apresentando maior estabilidade e tolerância frente ao aumento de carga afluyente de nitrogênio.

A eficiência do processo Anammox frente à aplicação de cargas crescentes de compostos nitrogenados utilizando o aumento de carga através do aumento da concentração de amônia gerou inibição do processo. No entanto, o aumento de carga através da redução do tempo de detenção hidráulica permitiu estabilizar a eficiência de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$ .

Em relação à comunidade Anammox, as condições operacionais semelhantes utilizadas no enriquecimento selecionaram a mesma população de Anammox, pertencente ao gênero *Candidatus Brocadia* em ambos os reatores, apesar das diferenças observadas no inóculo. Pois, a comunidade Anammox da amostra inoculada, lodo da *Wetland* construída, era constituída por um único gênero Anammox, *Candidatus Brocadia*, enquanto a amostra da REGAP, apresentava de três gêneros Anammox: *Candidatus Anammoxoglobus*, *Candidatus Kuenenia* e *Candidatus Brocadia*. Estes resultados indicaram que os inóculos têm um efeito significativo sobre a composição da biomassa microbiana desenvolvida nos reatores, mas as condições operacionais aplicadas desempenham um papel importante na seleção da comunidade de bactérias Anammox.

Quanto a estrutura da comunidade bacteriana enriquecida em ambos os reatores, foi observado que a composição se mostrou distinta. Apesar dos grupos predominantes terem sido comuns. Os filos dominantes detectados em ambos os reatores foram *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* e *Acidobacteria*. O filo *Bacteroidetes* frequentemente observado em reatores Anammox não foi detectado. No entanto, os filos *Acidobacteria* e *GN04* foram

observados pela primeira vez em reatores Anammox sugerindo a sua importância para este processo.

## CAPÍTULO 7

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar os fatores que possam interferir na estabilidade do processo Anammox de RI e RII como: matéria orgânica carbonácea, ácidos e compostos tóxicos como fenol, bem como avaliar essa interferência na estrutura da comunidade microbiana.

Testar em RII a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal utilizando efluente da REGAP, uma vez que esse reator (RII) foi desenvolvido a partir do lodo coletado na ETE - REGAP e apresentou a melhor eficiência e estabilidade quando comparado a RI. Além, de possivelmente, possuir já uma comunidade microbiana adaptada a esse efluente.

Estudar a ecologia da comunidade microbiana desenvolvida no reator após a introdução do efluente da REGAP e relacionar esse resultados com a eficiência da atividade Anammox do reator.

## CAPÍTULO 8

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNES, I. B.; PRA, J.; KUNZ, A.; STEINMETZ, R. **Avaliação da capacidade de remoção de Nitrogênio por processo ANAMMOX em escala de bancada.** In: Seminário de Desenvolvimento da Pesquisa, 12, Concórdia. Anais, Concórdia: UnC, 2008.

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

APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22 ed, Washington, DC, 2012.

ARAUJO, J.C.; CAMPOS, A.P.; 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.64.7, p. 1428-1434p, 2011.

ARAUJO, J.C.; CORREA, M.M., SILVA; CAMPOS, A.P.; GODINHO, V.M.; Von SPERLING, M.; CHERNICHARO, C.A.L. **Investigation of aerobic and anaerobic ammonium—oxidising bacteria presence in a small full- scale wastewater treatment system comprised by UASB reactor and three polishing ponds.** *Water Science and Technology*, v.61.3, 2010.

BAIRD, C. **Química ambiental.** Porto Alegre: Bookman, 2002.

BJÖRNSSONA, PHILIP HUGENHOLTZB, GENE W. TYSONB, LINDA L. BLACKALL. **Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal<sup>c</sup>.** *Microbiology*. August., 148:2309-231p, 2002

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

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.

CAMPOS, A.P.V. **Enriquecimento e caracterização de bactérias Anammox para a remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes.** Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. 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.

CARVALHO, MAYRA COSTA DA CRUZ GALLO, SILVA, DANIELLE CRISTINA GREGORIO. **Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas**. *Ciencia Rural*. v.40, n.3, 735-744p. 2010

CASAGRANDE,C.G KUNZ, A., PRA DE,M>C,PERONDI,T.,SOARES,H. **High-rate removal using na anammox colum reactor**, Florianópolis, 2010.

CENTRO DE PESQUISA E TREINAMENTO EM SANEAMENTO UFMG/COPASA-CEPTS ,UFMG / COPASA. [http://issuu.com/severidade/docs/livreto\\_cepts](http://issuu.com/severidade/docs/livreto_cepts). (acesso em 10 Junho 2011).

CHAMCHOI, N.; NITISORAVUT, S. **Anammox enrichment from different conventional sludges**. *Chemosphere*, v. 66, 2225-2232p, 2007.

CHEN, H.; LIU, S.; YANG, F. XUE, Y.; WANG, T. **The developmpt of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal**. *Bioresour. Technol.*, 100, 1548-1554p, 2009.

CHO, S. Y. TAKAHASHI, N. FUJII, Y. YAMADA , H. SATOH, AND S. OKABE. **Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed Anammox reactor**. *Chemosphere*. Feb;78(9):1129-1135p. 2010.

DAIMS, H.; NIELSEN, J. L.; NIELSEN, P. H.; SCHLEIFER, K. H.; WAGNER, M. **In situ characterization of nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants**. *Applied and Environmental Microbiology*, 5273-5284p, v. 67, n. 11, 2001.

DAPENA-MORA, A., VAN HULLE, S.W.H., CAMPOS, J.L., MENDEZ, R., VAN ROLLEGHEM, P.A., JETTEN, M., **Enrichment of Anammox biomasa from municipal activated sludge: experimental and modeling results**. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 79: 1421-1428p, 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**. *J. Biosci. Bioeng.* **107**, 281–286p, 2009.

DONG, Z. & SUN, T. **A potential new process for improving nitrogen removal in constructed wetlands—Promoting coexistence of partial-nitrification and Anammox**. *Ecological Engineering*; 31, 69–78p, 2007.

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

EGLI, K., FANGER, 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**. *Arch. Microbiol.* 175: 198-207p, 2001.



ETCHEBEHERE, C. A. CABEZAS, P. DABERT, AND L. MUXI, **Evolution of the bacterial community during granules formation in denitrifying reactors followed by molecular, culture-independent techniques.** *Water Science and Technology* v 48 n° 6, 75–79 2003p.

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, 170-174p, 2012.

FERNÁNDEZ, I.; VÁZQUEZ-PADÍN, J.R.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPOS, J.L.; MÉNDEZ, R. **Biofilm and granular systems to improve Anammox biomass retention.** *Biochemical Engineering Journal*, 42(3): 308-313, 2008.

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

FUX, C.; BOEHLER, M.; HUBER, P.; BRUNNER, I.; SIEGRIST, H. R. **Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in a pilot plant.** *Journal of Biotechnology*, 99:295–306p, 2002.

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

GODINHO, V. M. **Investigação de bactérias patogênicas por técnicas moleculares em um sistema de tratamento de esgotos composto por reator UASB e lagoas de polimento.** Tese (doutorado) - Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

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, 752-758p, 2012.

HIRSCH M. D., LONG Z. T. AND SONG B. **Anammox bacterial diversity in various aquatic ecosystems based on the detection of hydrazine oxidase genes (hzoA/hzoB).** *Microbial Ecology*, 61(2), 264-276p, 2010.

HU, B. L., ZHENG, P., TANG, C. J., CHEN, J. W., VAN DER BIEZEN, E., ZHANG, L., NI, B. J., JETTEN, M. S. M., YAN, J., YU, H. Q., KARTAL, B. **Identification and quantification of Anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors.** *Water Res.* 3:1-7p, 2010.

HU. M. , X. WANG, X. WEN, AND Y. XIA. **Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis.** *Bioresour Technol.* Aug;117:72-9. 2012

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.

JETTEN, M. S. M., NIFTRIK, L. V. V., STROUS, M., KARTAL, B., KELTJENS, J. T., AND OP DEN CAMP, H. J., **Biochemistry and molecular biology of Anammox bacteria**. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 44, 65–84p, 2009.

JETTEN, M., SCHMID, M., VAN DE PAS-SCHOONEN, K., SINNINGHE DAMSTE, J., STROUS, M. **Anammox organisms: enrichment, cultivation, and environmental analysis**. Methods Enzymol, **397**, 34–57p, 2005.

JETTEN, M.S.M., VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T., FUERST, J.A., WAGNER, M. KUENEN, J.G., STROUS, M. **Microbiology of the anaerobic ammonium oxidation “ANAMMOX” process**. Resumo da palestra apresentada nos Anais do ISME-9 (9th International symposium on microbial ecology), Amsterdã, 26-31 Agosto, 115p, 2001a.

JETTEN, M.S.M., VAN DONGEN, L.G.J.M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. **The combined sharon/Anammox process**. stowa: Foundation for Applied Water Researche IWA Publishing. London, UK, 2002.

JETTEN, M.S.M., WAGNER, M., FUERST, J.A., VAN LOOSDRECHT, M., KUENEN, G., STROUS, M. **Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (“Anammox”) process**. Current Opinion in Biotechnology, 12, 283–288p, 2001b.

JIN, R.; YANG, G.; YU, J.; ZHENG, P. **The inhibition of Anammox process: a review**. Chemical Engineering Journal, v. 197, 67-79p, 2012.

KARTAL, B., RATTRAY, J., VAN NIFTRIK, L. A., VAN DE VOSSENBERG, J., SCHMID, M. C., WEBB, R. I., SHOUTEN, S., FUERST, J. A., SINNINGHE DAMSTÉ, J., JETTEN, M. S. M., STROUS, M. **Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria**. Syst Appl Microbiol 30:39–49p, 2007.

KARTAL, B., VAN NIFTRIK, L., RATTRAY, J., VAN DE VOSSENBERG, J. L. C. M., SCHMID, M. C., DAMSTÉ, J. S., JETTEN, M. S. M., STROUS, M. **Candidatus ‘brocadia fulgida’: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium**. FEMS Microbiol Ecol 63:46–55p, 2008.

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, 127-130p, 2011.

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, 211-262p, 2012.

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.

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.

LAN, C. L.; KUMAR, M.; WANG, C. C.; LIN, J. G. **Development of simultaneous partial nitrification, Anammox and denitrification (SNAD) process in a sequential batch reactor.** *Bioresource Technology*, v. 102; 5514–5519p, 2011.

LI, H. S. CHEN, B.Z. MU, AND J.D. GU. **Molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs.** *Microb. Ecol.* 60 771–783p. 2010.

LI, M., HONG, Y., KLOTZ, M. G., GU, J. D. **A comparison of primer sets for detecting 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase genes of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine sediments.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 86:781–790p, 2010.

LOPEZ, 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, 233-241p, 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/Qualificação). 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.

MARTINS, T.H. **Conversão de compostos nitrogenados em reatores biológicos: operação, caracterização microbiológica e filogenética.** Tese (Doutorado) –Programa de Pós Graduação da Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, São Carlos, 2010.

MENDONÇA M.C.M. **Caracterização e tratabilidade de resíduos líquidos gerados em terminais de armazenamento de álcool e derivados de petróleo.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2004.

METCALF & EDDY. **Wastewater engineering: treatment, and reuse.** New York: Metcalf & Eddy, Inc., 4 th. Ed., 1819p. 2003.

MISSAGIA B. S. **Estudo das Comunidades Bacterianas em Filtros Biológicos Percoladores Utilizados para o Pós-Tratamento de Efluentes de um Reator UASB.** Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2010.

MOORE.T.A., **Prevalence of Anaerobic Ammonium-Oxidizing bacteria in contaminated groundwater,** *Environ. Sci. Technol.* 45 pp.7217–7225, 2011.

MULDER, A., VAN DE GRAAF, A. A., ROBERTSON, L. A., KUENEN, J. G. **Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidised bed reactor.** *FEMS Microbiology Ecol.*, 16, 177-184p, 1995.

NEEF, A., AMANN R, SCHLESNER H, SCHLEIFER KH. **Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16SrRNA-targed probes.** *Microbiology* 144:3257-3266p, 1998.

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, 2652-2656p, 2010.

PARK, H., ROSENTHAL, A., JEZEK, R., RAMALINGAM, K., FILLOS, J., CHANDRAN, K. **Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial ecology of anaerobic ammonia oxidation (Anammox) bioreactor communities**. Water Research, 44, 5005 – 5013p, 2010.

PEREIRA ALYNE DUARTE. **Caracterização microbiana e avaliação do efeito do fenol em um reator em batelada sequencial com atividade Anammox**. Belo Horizonte ,2013, 128p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizont ,2013.

PETROBRAS:<http://www.petrobras.com.br/rs2009/pt/relatorio-de-sustentabilidade/meio-ambiente/emissoes-efluentes-e-residuos/efluentes-e-residuos> (acesso 14 Junho 2011). 4390–4398p.

PHILIPS, A. M. L. **Utilização de reator de biodisco para tratamento de efluentes com altas concentrações de nitrogênio**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

QIAO, S.; KAWAKUBO, Y.; CHENG, Y.; NISHIYAMA, T.; FUJII, T.; FURUKAWA, K. **Identification of bacteria coexisting with Anammox bacteria in an upflow column type reactor**. Biodegradation, 20(1):117-24p, 2009.

QUAN, L.M.; KHANH, DO P.; HIRA, D.; FUJII, T.; FURUKAWA, K. **Reject water treatment by improvement of whole cell Anammox entrapment using polyvinyl alcohol/alginate gel**. Biodegradation, 22(6):1155-67p, 2011.

QUAN, Z. X., RHEE, S.K., ZUO, J. E., YANG, Y., BAE, J. W., PARK, J. R., LEE, S. T., PARK, Y. H. **Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) reactor**. Environ Microbiol 10: 3130-3139p, 2008.

REGINATTO , V., TEIXEIRA, R.M., PEREIRA, F., SCHMIDELL, W., FURIGO Jr, A, MENES, R., ETCHEBEHERE, C., SOARES, H.M. **Anaerobic ammonium oxidation in a bioreactor treating slaughterhouse wastewater**. Brazilian J. of Chemical Engineering 22, N.4: 593-600p, 2005.

REIS, J.A.T; MENDONÇA, A.S.F. **Análise técnica dos novos padrões brasileiros para amônia em efluentes e corpos d'água**. Artgo técnico Eng. Sanit Ambient, v14n 3: 353-362p, 2009.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALLONA, F; MULLIS, K.B.; HORN,G.T.; ERLICH, H.A. **Enzymatic application of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia**. Science, v.230, p. 1350-1354p, 1985.

SÀNCHEZ-MELSIÓ, A., CÁLIZ, J., BALAGUER, M. D., COLPRIM, J., VILA, X. **Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of Anammox bacteria for N-removal bioreactors systems**. Chemosphere 75 (2), 169–179p, 2009.

SANTIAGO V. M., COELHO E.B.A.P., ZANETTE C.L. AND ALMEIDA J.H.C. ( 2005) **Nirificação em biodiscos** <http://www.verlag.com.br/arquivos/links/16.pdf> (acesso 15 de Junho 2011).

SANTOS, A.L.; PEIXOTO,R; ROSADO,A.S.; **New approaches to understanding microbiol diversity in wastewater, landfills and leachate treatment.** *Oecologia brasiliensis* 13(4):631-68p, 2009.

SCHEEREN MARINA B.; KUNZ AIRTON, STEINMETZ RICARDO L. R., DRESSLER VALDERI L.O **o processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de águas residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.* v.15 n.º.12 Campina Grande. Dec. 2011.

SCHIERHOLTNETO, G.F.. **Desenvolvimento de uma flora de microrganismos oxidadores anaeróbios de amônia utilizando in,óculos provenientes de dejetos suíno.**Dissertação(Mestrado)-Programa de Pós Graduação de Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SCHMID, M., MAAS B., DAPENA A., VAN DE PAS-SCHOONEN K., VAN DE VOSSENBERG J., KARTAL B., VAN NIFTRIK L., SCHMIDT I., CIRPUS I., KUENEN J.G., WAGNER M., DAMSTÉ J.S.S., KUYPERS M., REVSBECH N.P., MENDEZ R., JETTEN M.S.M., STROUS M. **Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) Bacteria.** *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1677-1684p, 2005.

SCHMID, M., WALSH, K., WEBB, R., RIJSTRA, W. I., VAN DE PASSCHOONEN, K., VERBRUGGEN, M.J., HILL, T., MOFFETT, B., FUERST, J., SCHOUTEN, S., DAMSTÉ, J.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. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 529-538p, 2003.

SILVA, C. CYNTHIA ; HELEN HAYDEN; TIM SAWBRIDGE; PAULINE MELE; RICARDO H KRUGER; MARILI VN RODRIGUES; GUSTAVO GL COSTA; RAMON O VIDAL; MAÍRA P SOUSA; ANA PAULA R TORRES; VÂNIA MJ SANTIAGO; VALÉRIA M OLIVEIRA SILVA. **Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment system.** *AMB Express.* 2012.

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.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 589-596p, 1998.

STROUS, M., KUENEN J.G., JETTEN M.S.M. **Key physiology of anaerobic ammonium oxidation.** *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3248-3250p, 1999b.

STROUS, M., PELLETIER, E., MANGENOT, S., RATTEI, T., LEHNER, A., TAYLOR, M. W., HORN, M., DAIMS, H., 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. **Deciphering the evolution and metabolism of an Anammox bacterium from a community genome.** *Nature* 440, 790–794p, 2006.

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, 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, 1-22p, 2009.

TIEDJE, J.M. Denitrification, pp. 1011-1026. In A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (eds.), **Methods of soil analysis, part 2.** Agronomy Monograph No. 9, Amer. Soc. Agron., Madison, WI, 1982.

TSUSHIMA, I., OGASAWARA, Y., KINDAICHI, T., SATOH, H., OKABE, S., **Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) biofilm reactors.** *Water Research* 41, 1623–1634p, 2007.

VAN DE GRAAF, A.A., de 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* 142: 2187-2196p, 1996.

VAN DER STAR W.R.L., ABMA W.R., BLOMMERS D., MULDER J-W., TOKUTOMI T., STROUS M., PICIOREANU C. AND VAN LOOSDRECHT, M.C.M. **Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale Anammox reactor in Rotterdam.** *Water Research*, 41, 4149-4163p, 2007.

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 to grow Anammox bacteria as free cells.** *Biotechnol. Bioeng.* 101; 286–294p, 2008.

VAN NIFTRIK, L.A., 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* 233, 7–13p, 2004.

VANOTTI, M. B., SZOGI A. A., **Novel Anammox bacterium isolate** .US Patent Appl.S/N 13/013,874 depositada 26/01/2011. US Patent Trademark Office.Washington.

VERSTRAETE, W. & PHILIPS, S. **Nitrification-denitrification processes and technologies in view contexts.** *Environmental pollution*, 102:717-726p, 1998.

VIANCELLI. **Caracterização e análise filogenética de Anammox: uma bactéria chave no ciclo do nitrogênio.** Tese( doutorados), Universidade Federal of Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. 2009.

XIAO Y, ZENG G. M., YANG, Z. H., LIU, Y. S., MA Y. H., YANG, L., WANG, R. J., XU, Z. Y. **Coexistence of nitrifiers, denitrifiers and Anammox bacteria in a sequencing batch biofilm reactor as revealed by PCR-DGGE.** *J. Appl Microbiol.* 106:496–505p, 2009.

XIAO-RAN LI, BING DU, HAI-XIA FU, RUO-FAN WANG, JIN-HUAN SHI, YUE WANG, MIKE S.M. JETTEN, ZHE-XUE QUAN, **The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) reactor community.** *Systematic and Applied Microbiology*. v. 32, July, 278–289p. 2009.

YE L, SHAO MF, ZHANG T, TONG AH, LOK S. **Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing.** Water Res. Oct 1;45(15):4390-8, 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.

W.R.L.VAN DER STAR; W.R. ABMA ,D. BLOMMERS; J-W MULDER; T. TOKUTOMI; M. STROUS; C. PICIOREANU; M.C.M. VAN LOOSDRECHT. **Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale Anammox reactor in rotterdam.** Water Res. 41, 4149–4163p. 2007.

ZHANG, L.; YANG, J.; MA Y, LI, Z.; FUJII, T.; ZHANG, W.; TAKASHI, N.; FURUKAWA, K. **Treatment capability of an up-flow Anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier.** Journal of Bioscience and Bioengineering, 110(1):72-8, 2010.

ZHANG, T. C. & LAMPE, D. G. **Sulfur: limestone autotrophic denitrification process for treatment of nitrate-contaminated water:** batch experiments. Water Research, 33:599-608p, 1999.

Zhang, J. Y. Zhang, Y. Li, L. Zhang, S. Qiao, F. Yang, and X. Quan, *Enhancement of nitrogen removal in a novel Anammox reactor packed with Fe electrode*, Bioresour. Technol. 114 p. 102-108, 2012.

ZHU, G. C.YIN, JETTEN M.S.M., ETTWIG.K.F, KUSCHK P. **Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems.** Applied Microbiology and Biotechnology,86:1043-1055p, 2010.