

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

CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE
BACTERIANA DE FILTROS BIOLÓGICOS
PERCOLADORES TRATANDO EFLUENTE
ANAERÓBIO

Érika Ferreira de Abreu Mac Conell

Belo Horizonte

2014

**CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE
BACTERIANA DE FILTROS BIOLÓGICOS
PERCOLADORES TRATANDO EFLUENTE
ANAERÓBIO**

Érika Ferreira de Abreu Mac Conell

Érika Ferreira de Abreu Mac Conell

**CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE
BACTERIANA DE FILTROS BIOLÓGICOS
PERCOLADORES TRATANDO EFLUENTE
ANAERÓBIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito ao título de Doutor em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de águas residuárias

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo

Co-orientador: Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2014

M129c

Mac Connell, Érika Ferreira de Abreu.

Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores tratando efluente anaeróbio [manuscrito] Érika Ferreira de Abreu Mac Conell. – 2014.

x, 143 f., enc.: il.

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo.

Coorientador: Carlos Augusto de Lemos Chernicharo.

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

Apêndices: f.133-143.

Bibliografia: f. 124-132.

1. Engenharia Sanitária - Teses. 2. Saneamento - Teses. 3. Águas residuais - Purificação - Teses. 4. Microbiologia sanitária - Teses. I. Araújo, Juliana Calábria de. II. Chernicharo, Carlos Augusto Lemos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Avenida Antônio Carlos, 6627 - 4º andar - 31270-901 - Belo Horizonte - BRASIL

Telefax: 55 (31) 3409-1882 - posgrad@desa.ufmg.br

<http://www.smarh.eng.ufmg.br>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Caracterização da comunidade bacteriana de filtros biológicos percoladores
tratando efluente anaeróbio

ÉRIKA FERREIRA DE ABREU MAC CONELL

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:

Prof. JULIANA CALÁBRIA DE ARAÚJO - Orientadora

Prof. CARLOS AUGUSTO DE LEMOS CHERNICHARO - Coorientador

Prof. MARCOS VON SPERLING

Prof. SILVANA DE QUEIROZ SILVA

Prof. CLAUDIA ETCHEBEHERE ARENAS

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH

Prof. Juliana Calábria de Araújo
Coordenadora

Versão Final aprovada por

Prof. Juliana Calábria de Araújo
Orientadora

Belo Horizonte, 23 de abril de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus, pelo Seu amor e presença constantes, que conduzem a minha vida e renova as minhas forças. Obrigada por me inspirar e me direcionar nos momentos difíceis e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho nos momentos mais importantes de minha vida!

Ao meu marido Hans, presente de Deus, que me acompanha em todos os momentos com seu amor, carinho, paciência, sinceridade e fidelidade.

Aos meus familiares: minha mãe Altina, meus irmãos Elias e Karla, minha avó Geralda, minha sogra Marilene e meus cunhados Giovane e Eric, que sempre acreditam no meu sucesso.

À Professora Juliana Calábria de Araújo pela orientação e oportunidade de crescimento profissional. Obrigada pelos conselhos, motivações e comprometimento. Agradeço também ao Professor Carlos Chernicharo pelo apoio como co-orientador e crédito no meu crescimento profissional desde a época do mestrado.

À equipe de professores Rogério Tenreiro, Ana Tenreiro, Sandra Chaves e Mário Gadanho do *Centro de Biodiversidade, Genómica Funcional e Integrativa* (BioFIG) da Universidade de Lisboa (Portugal) pelo acolhimento e orientação no doutorado-sanduíche. Em especial, à professora Sandra pela receptividade, atenção e orientação constante durante o estágio.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Grazy, Cíntia, Renata, Cristina, Luciene, Alyne, Vítor, Aracele, Marcela, Luciana e Ana Maria. Alguns ficaram pouco tempo (Adriana, Valquíria e Isabel), mas foram imprescindíveis enquanto estiveram comigo e deixaram saudades! Obrigada pelo apoio, conversas e risadas, pelos momentos de intenso trabalho, pela amizade de vocês!

Aos amigos e companheiros brasileiros e portugueses que fiz durante minha estadia em Lisboa, em especial à Esther, Diego, sr. Banha, Vânia, Joana, Eliseu, Madalena, dona Dulce..., enfim, são tantos que infelizmente não dá para colocar todos aqui! Obrigada pelo carinho, companheirismo e receptividade!

Agradeço em especial ao Emanuel, Cristiane, Sielen, Matheus, Karoline e Patrícia que marcaram pelo esforço e comprometimento no trabalho em equipe de monitoramento dos FBPs, nas análises físico-químicas e biológicas. Agradeço especialmente ao Paulo Gustavo pelas conversas, orientações e sugestões que foram fundamentais e grandemente contribuíram para esse trabalho.

Aos colegas e funcionários do DESA: Iara, Reginaldo, Cláudia e Alexandre, por todo o apoio prestado em todos os momentos. Em especial à Suzane Inácio, pelo suporte administrativo fundamental em nossas pesquisas, além do carinho e da amizade.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pelo ensino, dedicação e conhecimentos ministrados nas disciplinas do curso;

À FAPEMIG pela bolsa concedida e apoio financeiro, ao CNPq e à FINEP pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

A pesquisa caracterizou a comunidade bacteriana desenvolvida em filtros biológicos percoladores (FBPs) utilizados no pós-tratamento de efluente de reator UASB. Os FBPs apresentavam configurações similares, porém um era preenchido por placas de polietileno e o outro, por placas intercaladas com espumas de poliuretano. O FBP de espuma apresentou maior retenção de biomassa e maiores eficiências de remoção de matéria orgânica carbonácea e íon amônio. Relações alimento/micro-organismo (g de DQO_{solúvel} /g de STV.d) estimadas para cada reator mostraram que as condições nutricionais eram mais escassas no FBP de espuma em virtude do maior acúmulo de biomassa nos seus compartimentos. Análises de pirosequenciamento mostraram que a comunidade bacteriana desenvolvida em cada reator foi completamente diferente, embora o filo predominante em ambos tenha sido *Proteobacteria*. No FBP de espuma, outros filios abundantes foram *Verrucomicrobia* e *Planctomycetes*, que incluem, respectivamente, bactérias oligotróficas de lento crescimento e com estrutura celular complexa, características de organismos K-estrategistas. No FBP de placa, entretanto, os outros grupos mais abundantes eram o filo *Acidobacteria* e a classe *Clostridia*, esta última conhecida por incluir bactérias generalistas de crescimento rápido, característica de organismos r-estrategistas. Dentro do ciclo do nitrogênio, o grupo predominante foi o de bactérias desnitrificantes. As abundâncias relativas de nitrificantes foram maiores no FBP de placa, entretanto, em termos absolutos, o meio-suporte de espuma teve maior quantidade dessas bactérias em virtude de sua maior capacidade de retenção de sólidos. A coexistência de nitrificantes, anammox e desnitrificantes nos compartimentos do FBP de espuma significa que diferentes vias metabólicas estavam envolvidas na remoção de compostos nitrogenados. Variações nas estruturas da comunidade bacteriana em geral, inclusive nas de AOB e de desnitrificantes, foram atribuídas principalmente às reduções nas concentrações de substratos (matéria orgânica, íon amônio, etc.) ocorridas ao longo dos compartimentos e ao longo do tempo. Conclui-se que o meio-suporte de espuma promoveu maior retenção de micro-organismos e diversificação de condições ambientais no FBP, selecionando uma biomassa essencialmente constituída por micro-organismos de crescimento lento, mais eficiente na remoção de compostos orgânicos e nitrogenados, resultando no aprimoramento do sistema UASB-FBP.

ABSTRACT

The study characterized the bacterial community developed in trickling filters (TF) used in the post-treatment of UASB reactor effluent. The TF had similar configurations, but one was filled with plates of polyethylene and the other, interspersed plates with polyurethane sponges. The sponge-TF showed higher biomass retention and higher removal efficiency of carbonaceous organic matter and ammonium ion. Food/ microorganism relationships ($\text{g COD}_{\text{soluble}} / \text{g TVS.d}$) estimated for each reactor showed that the nutritional conditions were scarcer in sponge-TF due to the higher biomass accumulation in their compartments. Pyrosequencing analyzes showed that bacterial community developed in each reactor was completely different, even though the predominant phylum has been *Proteobacteria* in both reactors. In the sponge-TF, other abundant phyla were *Verrucomicrobia* and *Planctomycetes*, which include, respectively, slow-growing oligotrophic bacteria and bacteria with complex cell structure, characteristics of K-strategist organisms. However in plate-TF, the other abundant groups were *Acidobacteria* phylum and *Clostridia* class, the latter known to include generalist fast-growing bacteria, characteristics of r-strategist organisms. Within the nitrogen cycle, the predominant group was the denitrifying bacteria. The relative abundances of nitrifying were higher in TF-plate, however, in absolute terms, sponge packing media retained greater amount of bacteria because of its greater capacity for solids retention. The coexistence of nitrifying, denitrifying and anammox in sponge-TF compartments means that different metabolic pathways were involved in the removal of nitrogenous compounds. Variations in the structures of the bacterial community in general, including in the AOB and denitrifying, were attributed primarily to reductions in the concentrations of substrates (organic matter, ammonium ion, etc.) occurring along the compartments and over time. We conclude that the sponge packing media promoted greater retention of micro-organisms and diversification of environmental conditions in the TF, selecting a biomass primarily constituted of slow-growing microorganisms, more efficient in the removal of organic and nitrogen compounds, resulting in enhancement of UASB-TF system.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
2.1 OBJETIVO GERAL	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 O CICLO MICROBIANO DO NITROGÊNIO	4
3.1.1 Amonificação.....	4
3.1.2 Nitrificação	5
3.1.3 Oxidação anaeróbia da amônia – processo Anammox.....	9
3.1.4 Desnitrificação	10
3.2 REMOÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS – SISTEMA UASB-FILTRO BIOLÓGICO PERCOLADOR	13
3.3 FATORES INTERFERENTES NO DESENVOLVIMENTO E ESTABELECIMENTO DE NITRIFICANTES EM SISTEMAS DE TRATAMENTO BIOLÓGICO.....	15
3.3.1 Mecanismos de retenção de micro-organismos em filtros biológicos percoladores.....	16
3.3.2 Influência da carga orgânica	19
3.3.3 Competição por oxigênio	21
3.3.4 Competição por íon amônio.....	23
3.3.5 Influência da alcalinidade.....	27
3.4 BIOMASSA E DINÂMICA DE SÓLIDOS EM FBPs	29
3.4.1 Distribuição da biomassa e dinâmica de sólidos em FBPs.....	29
3.4.2 Desenvolvimento de biomassa heterotrófica em biofilmes autotróficos.....	30
3.5 DINÂMICAS POPULACIONAIS E ABUNDÂNCIAS DE MICRO-ORGANISMOS NITRIFICANTES EM DIVERSOS SISTEMAS DE TRATAMENTO BIOLÓGICO	31
3.5.1 Comunidades microbianas em sistemas de lodos ativados	33
3.5.2 Abundâncias relativas de AOB e NOB em sistemas nitrificantes	34
3.5.3 Quantificação de nitrificantes por PCR tempo real em diversos sistemas de tratamento.....	35
3.5.4 Uso de pirosequenciamento 454 em estudos de ecologia microbiana.....	36
3.6 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE MEIO-SUPORTE PARA RETENÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE BIOMASSA NITRIFICANTE.....	40
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
3.7.1 Índices de diversidade α	42
3.7.2 Análise de componentes principais.....	43
3.8 ANÁLISE CRÍTICA DA LITERATURA	44
4 HIPÓTESES E PREMISSAS.....	46
5 METODOLOGIA	48
5.1 DESCRIÇÃO DO APARATO EXPERIMENTAL	48
5.2 DEFINIÇÃO DOS PERÍODOS OPERACIONAIS	49
5.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	50
5.4 COLETA DE BIOMASSA E PREPARO DAS AMOSTRAS	50
5.5 ANÁLISES MOLECULARES	52
5.5.1 Extração e purificação de DNA.....	53
5.5.2 Amplificação de genes específicos por PCR	54
5.5.3 Análise da estrutura da comunidade de bactérias oxidadoras de amônia nos FBPs por PCR-DGGE	55
5.5.4 Quantificação de AOB, NOB, anammox e desnitrificantes por PCR em tempo real	57
5.5.5 Pirosequenciamento 454.....	59
5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1	ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS E MONITORAMENTO DO SISTEMA UASB-FBP	63
6.2	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA EM TERMOS DE SÓLIDOS TOTAIS VOLÁTEIS E DNA E DISTRIBUIÇÃO DE SUBSTRATOS AO LONGO DOS FBPs	67
6.2.1	<i>Estimativas de STV e da relação A/M em cada FBP</i>	<i>67</i>
6.2.2	<i>Teores de STV, STF e de DNA por grama de biomassa.....</i>	<i>70</i>
6.2.3	<i>Perfis físico-químicos ao longo das profundidades dos FBPs.....</i>	<i>72</i>
6.2.4	<i>Análise de componentes principais com base nas características físico-químicas dos efluentes ..</i>	<i>74</i>
6.2.5	<i>Conclusões do item 6.2</i>	<i>78</i>
6.3	QUANTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA ENVOLVIDA NO CICLO DO NITROGÊNIO POR PCR EM TEMPO REAL	78
6.3.1	<i>Estimativa das concentrações de AOB, anammox, Nitrobacter, Nitrospira, desnitrificantes e bactérias totais por grama de STV.....</i>	<i>78</i>
6.3.2	<i>Distribuição relativa das bactérias do ciclo do nitrogênio e abundâncias em relação ao total de bactérias.....</i>	<i>82</i>
6.3.3	<i>Análise de componentes principais com base nas características físico-químicas e moleculares do lodo</i>	<i>84</i>
6.3.4	<i>Análise de componentes principais com base em todas as características dos lodos e dos efluentes</i>	<i>86</i>
6.3.5	<i>Conclusões do item 6.3</i>	<i>87</i>
6.4	CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DA COMUNIDADE DE AOB POR DGGE.....	88
6.4.1	<i>Conclusões do item 6.4</i>	<i>93</i>
6.5	CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA DESENVOLVIDA EM CADA TIPO DE MEIO-SUPORTE POR PIROSEQUENCIAMENTO	93
6.5.1	<i>Caracterização da comunidade bacteriana em nível de filo</i>	<i>93</i>
6.5.2	<i>Caracterização da comunidade de bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio.....</i>	<i>98</i>
6.5.3	<i>Conclusões do item 6.5</i>	<i>107</i>
6.6	INFLUÊNCIA NAS CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATOS NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA AO LONGO DA PROFUNDIDADE DO FBP DE ESPUMA	108
6.6.1	<i>Caracterização da comunidade de bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio.....</i>	<i>108</i>
6.6.2	<i>Conclusões do item 6.6</i>	<i>112</i>
6.7	AValiação da influência das concentrações de substratos na estrutura da comunidade ao longo do tempo no FBP de espuma.....	113
6.7.1	<i>Caracterização da comunidade de AOB, NOB e anammox</i>	<i>113</i>
6.7.2	<i>Caracterização da comunidade de desnitrificantes.....</i>	<i>114</i>
6.7.3	<i>Outros grupos taxonômicos abundantes</i>	<i>115</i>
6.7.4	<i>Comparação dos resultados de abundâncias relativas de bactérias do ciclo do nitrogênio obtidos por PCR em tempo real e por pirosequenciamento 454</i>	<i>117</i>
6.7.5	<i>Conclusões do item 6.7</i>	<i>120</i>
7	CONCLUSÕES GERAIS.....	121
8	RECOMENDAÇÕES.....	122
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
	APÊNDICES	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Esquema dos processos biológicos envolvidos no ciclo do nitrogênio.....	4
Figura 3.2 – Esquema das etapas e enzimas envolvidas no processo de desnitrificação.....	11
Figura 3.3 – Formação e estrutura de um biofilme.....	16
Figura 3.4 – Imagens de imobilização de biomassa em meio-suporte de espuma.....	19
Figura 5.1 – Sistema UASB seguido por FBPs e materiais para retenção de biomassa.....	48
Figura 5.2 – Imagens das placas corrugadas de polietileno amostradas do FBP de placa para coleta de biomassa.....	51
Figura 5.3 – Imagens dos pedaços de espuma de poliuretano amostrados do FBP de espuma para coleta de biomassa.....	52
Figura 5.4 – Etapas das análises moleculares da biomassa amostrada nos FBPs.....	53
Figura 5.5 – Representação esquemática da análise de pirosequenciamento 454.....	60
Figura 6.1 – Série temporal de COV aplicada nos FBPs e períodos de amostragem.....	63
Figura 6.2 – Concentrações de N-amoniaco afluente aos FBPs (efluente do reator UASB) ..	64
Figura 6.3 – Séries temporais das concentrações efluentes de nitrito e nitrato e eficiências de remoção de N-amoniaco no FBP de placas.....	66
Figura 6.4 – Séries temporais das concentrações efluentes de nitrito e nitrato e eficiências de remoção de N-amoniaco no FBP de espuma.....	66
Figura 6.5 – Estimativa da quantidade de sólidos totais voláteis (STV) ao longo das profundidades do FBP de placa.....	68
Figura 6.6 - Estimativa da massa de sólidos totais voláteis (STV) ao longo das profundidades do FBP de espuma.....	68
Figura 6.7 – Teores de sólidos totais voláteis (STV) e sólidos totais fixos (STF) e concentrações de DNA por grama de STV nas amostras de lodo do FBP de placa.....	70
Figura 6.8 – Teores de sólidos totais voláteis (STV) e sólidos totais fixos (STF) e concentrações de DNA por grama de STV nas amostras de lodo do FBP de espuma....	71
Figura 6.9 – Perfis de oxigênio dissolvido (OD), íon amônio (N-NH ₄ ⁺) e nitrato (N-NO ₃ ⁻) ao longo das profundidades do FBP de placa nos três períodos de monitoramento.....	72
Figura 6.10 – Perfis de oxigênio dissolvido (OD), íon amônio (NH ₄ -N) e nitrato (NO ₃ -N) ao longo das profundidades do FBP de espuma nos três períodos de monitoramento.....	73
Figura 6.11 – Perfis de nitrito (NO ₂ -N) ao longo das profundidades dos FBPs nos três períodos de monitoramento.....	73
Figura 6.12 – Projeção das variáveis físico-químicas que caracterizavam os efluentes do sistema UASB-FBP. Os três primeiros componentes explicaram 81% das variações entre os compartimentos.....	76
Figura 6.13 – Análise de componentes principais com base nas características físico-químicas dos efluentes. Os três primeiros componentes explicaram 81% das variações entre os compartimentos.....	77
Figura 6.14 – Abundâncias de genes de bactérias totais, AOB, anammox, <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i> , desnitrificantes por grama de STV no FBP de placa.....	79
Figura 6.15 – Abundâncias de genes de AOB, anammox, <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i> , desnitrificantes e bactérias totais por grama de STV no FBP de espuma.....	81
Figura 6.16 – Distribuição relativa de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio e abundância em relação ao total de genes de bactérias nas amostras do FBP de placa.....	83
Figura 6.17 – Distribuição relativa de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio e abundância em relação ao total de genes de bactérias nas amostras do FBP de espuma.....	84

Figura 6.18– Análise de componentes principais com base nas características físico-químicas e biológicas dos lodos.Os três primeiros componentes explicaram 52% das variações entre os compartimentos.....	85
Figura 6.19 – Análise de componentes principais com base em todas as características dos efluentes e dos lodos.Os três primeiros componentes explicaram 51,3% das variações entre os compartimentos.....	87
Figura 6.20 – Perfis populacionais de AOB nas diferentes profundidades de ambos os FBPs nos três períodos amostrados	89
Figura 6.21 – Associação filogenética das bandas do DGGE elaborada a partir de seqüências parciais do gene amoA de AOB recuperadas de ambos os FBPs.	92
Figura 6.22 – Composição da comunidade bacteriana, em nível de filo, presente em ambos FBPs em P1, conforme os resultados de pirosequenciamento	95
Figura 6.23 – Análise de componentes principais com base nos grupos taxonômicos detectados no pirosequenciamento. Os três primeiros componentes explicaram 57,5% das variações entre os compartimentos	98
Figura 6.24 – Composição da comunidade de AOB, NOB e anammox encontrados no topo e no fundo de ambos os FBPs em P1, conforme resultados do pirosequenciamento.	99
Figura 6.25 – Composição da comunidade de bactérias desnitrificantes encontradas no topo (1,05 m) e no fundo (4,20 m) de ambos os FBPs em P1, conforme resultados do pirosequenciamento.....	101
Figura 6.26 – Comparação dos grupos taxonômicos predominantes (acima de 3% em pelo menos uma amostra) no topo (1,05 m) e no fundo (4,20 m) de ambos os FBPs em P1	104
Figura 6.27 – Composição da comunidade de AOB, NOB e anammox ao longo da profundidade do FBP de espuma em P1, conforme resultados do pirosequenciamento.	109
Figura 6.28 – Composição da comunidade de bactérias desnitrificantes ao longo da profundidade do FBP de espuma em P1, conforme resultados do pirosequenciamento	110
Figura 6.29 – Grupos taxonômicos predominantes (acima de 3% em pelo menos uma amostra) ao longo das profundidades do FBP de espuma em P1	111
Figura 6.30 – Composição da comunidade de AOB, NOB e anammox encontrada no topo e no fundo do FBP de espuma em P1 e P3, conforme resultados do pirosequenciamento.	113
Figura 6.31 – Composição da comunidade de bactérias desnitrificantes encontradas no topo e no fundo do FBP de espuma em P1 e P3.....	114
Figura 6.32 – Comparação dos grupos taxonômicos predominantes (acima de 3% em pelo menos uma amostra) no topo (1,05 m) e no fundo (4,20 m) do FBP de espuma em P1 e P3, conforme resultados do pirosequenciamento.....	116
Figura 6.33 – Comparação das abundâncias relativas de bactérias do ciclo do nitrogênio estimadas, por PCR em tempo real e pirosequenciamento, em ambos os FBPs em P1 .	118
Figura 6.34 – Comparação das abundâncias relativas de bactérias do ciclo do nitrogênio estimadas, por PCR em tempo real e pirosequenciamento, ao longo do FBP de espuma em P1	118
Figura 6.35 – Comparação das abundâncias relativas de bactérias do ciclo do nitrogênio estimadas, por PCR em tempo real e pirosequenciamento, no topo e no fundo do FBP de espuma em P1 e P3	119
Figura 0.1– Análise da correlação linear entre os valores de STV (g/ g de biomassa fresca) e de DNA (µg/ g de biomassa congelada) de cada FBP	135
Figura 0.2 - Perfis populacionais de bactérias em geral nas diferentes profundidades de ambos os FBPs.....	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1– Processos essenciais e exemplos de procariontes no ciclo do nitrogênio	12
Tabela 3.2 – Fatores ambientais que afetam a nitrificação e implicações recorrentes	27
Tabela 3.3 – Diversidade de <i>Bacteria</i> encontrada em vários ambientes e determinada por pirosequenciamento 454.....	38
Tabela 5.1– Principais características do sistema UASB/FBP.....	49
Tabela 5.2 – Parâmetros físico-químicos investigados, frequência de amostragem e metodologia para a realização das análises no monitoramento (campanhas de amostragem) do sistema UASB/FBP	50
Tabela 5.3 – Iniciadores específicos utilizados nas análises de biologia molecular	54
Tabela 5.4 – Equações das curvas-padrão e eficiências dos ensaios da PCR em tempo real de quantificação absoluta	59
Tabela 5.5 – Amostras selecionadas para análise de pirosequenciamento 454.....	60
Tabela 6.1 – Faixas de COV aplicada aos FBPs e concentrações efluentes de matéria orgânica e de compostos nitrogenados do sistema UASB/ FBP.....	65
Tabela 6.2 – Eficiências de remoção de matéria orgânica e amônia e consumo de alcalinidade nos FBPs pós-reator UASB	67
Tabela 6.3 – Valores estimados da relação A/M para cada FBP em P1, P2 e P3	69
Tabela 6.4 – Análise de componentes principais com base nas características dos efluentes: autovalores (<i>eigenvalues</i>) e porcentagens da variação explicadas por cada componente	74
Tabela 6.5 – Análise de componentes principais com base nas características dos lodos: autovalores (<i>eigenvalues</i>) e porcentagens da variação explicadas por cada componente	85
Tabela 6.6 – Análise de componentes principais com base nas características dos efluentes e dos lodos: autovalores (<i>eigenvalues</i>) e porcentagens da variação explicadas por cada componente.....	86
Tabela 6.7 – Identificação das bandas de DGGE associadas às Figuras 6.20A e 6.20B, tendo, como gene-alvo, parte do gene <i>amoA</i>	91
Tabela 6.8 – Análise da diversidade das amostras de ambos os FBPs por meio de índices de diversidade α	96
Tabela 6.9 – Análise de componentes principais com base em todos os táxons do pirosequenciamento: autovalores (<i>eigenvalues</i>) e porcentagens da variação explicadas por cada componente.....	97
Tabela 6.10 – Abundâncias relativas dos grupos taxonômicos predominantes (1 e 3%) nos FBPs	103
Tabela 0.1 – Quantidades de biomassa removida do FBP de placa e estimativas das concentrações de STV	134
Tabela 0.2– Quantidades de biomassa removida do FBP de espuma e estimativas das concentrações de STV	134
Tabela 0.3 – Estimativa das concentrações médias de DNA por grama de biomassa nos diferentes pontos amostrados do FBP de placa	133
Tabela 0.4– Estimativa das concentrações médias de DNA por grama de biomassa nos diferentes pontos amostrados do FBP de espuma.....	133
Tabela 0.5 – Estimativa das concentrações de produtos de PCR	136
Tabela 0.6 – Descrição resumida dos grupos taxonômicos com abundâncias relativas acima de 3% em pelo menos uma amostra.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- Anammox:** *Anaerobic Ammonium Oxidation* ou oxidação anaeróbia da amônia
- AOB:** *Ammonium Oxidizing Bacteria* ou bactérias oxidadoras de amônia
- Bis:** N, N'-metileno bis acrilamida
- COPASA:** Companhia de Saneamento de Minas Gerais
- DGGE:** *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* ou eletroforese em gel com gradiente desnaturante
- DHS:** *Downflow Hanging Sponge*
- EDTA:** etilenoaminotetraacetato de sódio diidratado $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{COONa}]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- FBP:** filtro biológico percolador
- FISH:** *Fluorescence in Situ Hybridization* ou hibridação *in situ* fluorescente
- NOB:** *Nitrite Oxidizing Bacteria* ou bactérias oxidadoras de nitrito
- PBS:** *Phosphate Buffer Saline* ou tampão fosfato salino
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase
- rpm:** rotações por minuto
- SMP:** *Soluble Microbial Products* ou produtos microbianos solúveis
- SS:** sólidos suspensos
- Taq:** *Thermoaquaticus*
- TAS:** taxa de aplicação superficial
- TDH:** tempo de detenção hidráulica
- TEMED:** N, N, N, N – tetrametil etileno diamina
- Tris:** (hidroximetil) aminometano – $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$
- TRS:** tempo de retenção de sólidos
- UASB:** *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* ou reator anaeróbio de manta de lodo de fluxo ascendente

1 INTRODUÇÃO

A ampliação de serviços de tratamento de esgotos ainda é uma demanda constante para universalização dos serviços de saneamento no Brasil. Nos processos de decisão e escolha de tecnologias para o tratamento de esgotos sanitários, as agências de fomento têm buscado pesquisas que associem o desenvolvimento de tecnologias simplificadas e sustentáveis, compatíveis com o contexto econômico do país.

Uma tecnologia simplificada de tratamento de esgoto doméstico bem-sucedida no Brasil tem sido os reatores anaeróbios de manta de lodo e fluxo ascendente, conhecidos como UASB, que apresentam as seguintes vantagens em relação a processos aeróbios de tratamento de esgotos: menor produção de lodo, baixo consumo energético, baixa demanda de área, baixos custos de operação, entre outras. Apesar das vantagens, os efluentes de reatores UASB ainda necessitam de etapa posterior de tratamento para remoção de matéria orgânica residual e de compostos nitrogenados, com vistas ao atendimento a padrões de lançamento de efluentes exigidos pela legislação ambiental.

Uma alternativa de pós-tratamento de efluentes de reatores UASB, promissora no contexto do Brasil, é o uso de filtros biológicos percoladores (FBP). Experiências práticas têm mostrado o potencial do sistema UASB/FBP em atender os padrões de lançamento preconizados pelas legislações ambientais vigentes (ALMEIDA, 2012). Embora os FBPs apresentem potencial para redução da carga orgânica presente nos efluentes de reatores UASB, a tecnologia ainda precisa ser aprimorada para a remoção de agentes poluidores como o nitrogênio-amoniaco (N-NH_4^+) ou íon amônio (NH_4^+). Como se trata de um sistema fundamentalmente biológico, o conhecimento das comunidades microbianas contidas nos biofilmes e das dinâmicas de substratos nos efluentes é essencial para compreensão dos processos metabólicos, o que permitiria aprimoramento do sistema de tratamento.

Para a melhor compreensão e identificação dos principais fatores que influenciam na nitrificação em FBPs pós-reatores UASB, vários estudos têm sido realizados no CePTS (Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento) da UFMG, localizado na ETE Arrudas – COPASA (Belo Horizonte/MG). Dentre eles, destacam-se o de Almeida (2009), que avaliou o desempenho de FBPs preenchidos com diferentes tipos de meio suporte no pós-tratamento de reator UASB e o de Missagia (2010), que realizou estudo da comunidade microbiana

desenvolvida nesses FBPs. Baseados nestes estudos, estratégias foram sugeridas para simplificação operacional de FBPs, bem como para aperfeiçoar o processo de nitrificação no sistema, tais como: o aumento da altura do compartimento reacional, aplicação de cargas orgânicas volumétricas menores (abaixo de 0,25 kg DBO/ m³.d), uso de meio-suporte inovador para retenção de biomassa e remoção de decantadores secundários.

Tais estratégias foram, então, aplicadas nos FBPs do presente estudo, sendo um deles preenchido com meio-suporte convencional (placas de polietileno), no qual a biomassa cresce aderida superficialmente, e outro, constituído por espumas de poliuretano, no qual a biomassa cresce intersticialmente. De fato, o meio-suporte de espuma promoveu o aprimoramento na remoção de compostos orgânicos e nitrogenados no pós-tratamento de efluentes de reatores UASB (ALMEIDA, 2012).

No campo da ecologia microbiana, ainda há um vasto mundo a ser conhecido. As ferramentas de biologia molecular têm proporcionado um grande avanço na microbiologia, uma vez que novos micro-organismos têm sido descobertos por meio de sequências de DNA isoladas de diversos ambientes. O conhecimento dos micro-organismos é fundamental para se compreender em um nível mais aprofundado o funcionamento dos ecossistemas, especialmente os sistemas de tratamento biológico de efluentes. Sob essa perspectiva, este trabalho buscou contribuir na compreensão da comunidade bacteriana que ocorre em filtros percoladores no pós-tratamento de efluente anaeróbico e como o tipo de meio-suporte influencia no seu comportamento e, portanto, no funcionamento do sistema de tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Caracterizar a comunidade bacteriana responsável pela conversão/remoção de matéria orgânica e compostos nitrogenados em dois filtros biológicos percoladores (um preenchido com meio-suporte de espuma e outro, com meio-suporte de placas), utilizados no pós-tratamento de efluente de reator UASB tratando esgoto sanitário.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a retenção de biomassa e a distribuição de substratos (matéria orgânica, compostos nitrogenados, oxigênio dissolvido, alcalinidade) nos dois diferentes tipos de meio-suporte;
- Caracterizar a comunidade bacteriana desenvolvida em cada tipo de meio-suporte, e especificamente aqueles micro-organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio;
- Avaliar a influência das concentrações de substratos na estrutura da comunidade bacteriana ao longo da profundidade do FBP de espuma;
- Avaliar a influência das concentrações de substratos na estrutura da comunidade bacteriana ao longo do tempo no FBP de espuma

os aminoácidos. Outro importante composto orgânico de nitrogênio é a uréia (H_2NCONH_2), que constitui o maior componente da urina. Durante a decomposição de aminoácidos, uréia e nucleotídeos (originários da degradação de ácidos nucleicos) ocorre a liberação de grupos amina, processo denominado de amonificação. A amonificação resulta na produção de nitrogênio reduzido sob duas formas: amônia não ionizada (NH_3) e amônia ionizada ou íon amônio (NH_4^+). A quantidade de cada forma é dependente do pH, sendo que em valores de pH menores que 9, a maior parte do nitrogênio reduzido está na forma de NH_4^+ . Aproximadamente 60% dos resíduos nitrogenados em ETE estão na forma orgânica e 40 % na forma inorgânica, sendo que na maioria das estações de tratamento as concentrações de nitrogênio amoniacal afluyente estão entre 25 e 30 mg/L (GERARDI, 2006). Amônia ionizada (NH_4^+) não é tóxica e é consumida por bactérias preferencialmente como nutriente. Por outro lado, a amônia (NH_3) é tóxica, podendo afetar a saúde de peixes em concentrações acima de 0,02 mg/L, sendo letal em concentrações entre 0,70 a 2,40 mg/L (PEREIRA & MERCANTE, 2005). Águas residuárias também contêm diferentes espécies de fósforo que, juntamente com os compostos nitrogenados, podem causar eutrofização devido ao crescimento excessivo de algas.

3.1.2 Nitrificação

A remoção de N-amoniacal em águas residuárias geralmente é feita por processos biológicos de nitrificação (etapas 1 e 2 da Figura 3.1) e desnitrificação (etapas 3 a 6 da Figura 3.1). A nitrificação é uma etapa conduzida por dois grupos microbianos distintos: AOB (*Ammonium Oxidizing Bacteria*, ou bactérias oxidadoras de amônia) e NOB (*Nitrite Oxidizing Bacteria*, ou bactérias oxidadoras de nitrito). Bactérias nitrificantes são organismos de vida livre, encontrados no solo e na água, entrando nos sistemas de tratamento através das águas residuárias e por infiltração. Ambos os grupos são aeróbios e de metabolismo *quimiolitotrófico*, obtendo energia para atividade celular a partir da oxidação de compostos químicos (AOB a partir da oxidação da amônia, NOB a partir da oxidação de nitrito) e carbono para síntese celular a partir de uma fonte inorgânica, no caso CO_2 na forma de alcalinidade bicarbonato (HCO_3^-) (GRAAF *et al.*, 1995; GERARDI, 2006). Não obstante, algumas amostras de NOB apresentam crescimento mixotrófico, sendo capazes de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono (DAIMS *et al.*, 2001).

Com relação aos grupos microbianos envolvidos na nitrificação, a oxidação da amônia ionizada era frequentemente associada à atividade dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrosococcus*,

enquanto que a oxidação do NO_2^- era atribuída à atividade do gênero *Nitrobacter*. Com o advento das técnicas de biologia molecular, novos gêneros foram identificados e reportados como os responsáveis pelos processos. Entre eles destacam-se os gêneros *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus* na oxidação íon amônio, e os gêneros *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* e *Nitrocystis* na oxidação de nitrito (AHN, 2006).

Nos mais diversos ambientes, a comunidade de NOB apresenta diversidade menor que a comunidade de AOB. O grupo das NOB inclui os gêneros *Nitrobacter* (Classe *Alphaproteobacteria*), *Nitrococcus* (Classe *Gammaproteobacteria*), *Nitrospina* (Classe *Deltaproteobacteria*) e *Nitrospira*, que corresponde um filo à parte, não filogeneticamente relacionado aos outros gêneros. *Nitrococcus* e *Nitrospina* constituem NOB de ambientes marinhos, enquanto *Nitrobacter* é o gênero dominante em solos. Embora o gênero *Nitrospira* tenha sido encontrado inicialmente em ambientes marinhos, vários estudos detectaram este gênero em outros ambientes (aquários de água doce, reatores de leito fluidizado, biofilmes removendo fósforo e lodos ativados), como também foi observado que esse gênero de NOB era o predominante (DAIMS *et al.*, 2001; DIONISI *et al.*, 2002).

Schramm *et al.* (1999), analisando a nitrificação em biorreator nitrificante por meio de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e microssores para avaliação das concentrações de substratos, observaram que os valores de K_s para *Nitrosospira* foram 40 mM de íon amônio e para *Nitrospira*, 10 mM de nitrito. K_s é a taxa de afinidade do micro-organismo pelo substrato, definida pela concentração de substrato que permite uma taxa de crescimento igual à metade do crescimento específico máximo do micro-organismo. Segundo os autores, estes valores eram 1 ou 2 ordens de magnitude menores que os de K_s da maioria das amostras de *Nitrosomonas*, inclusive *N. europaea*, e da maioria das espécies de *Nitrobacter* encontradas na literatura.

No contexto ecológico, isso significa que entre as bactérias nitrificantes, *Nitrosospira* e *Nitrospira* são capazes de utilizar baixas concentrações de substratos mais eficientemente que as espécies de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, respectivamente. Esse comportamento reflete o modelo mecanístico de Andrews e Harris (1986), que sugeriram a seleção de estratégias de vida *r* versus *K* para comunidades microbianas. A essência do conceito é que os micro-organismos se esforçam para maximizar sua capacidade de sobrevivência em ambientes ricos ou pobres em nutrientes. Segundo os autores, ambos, *r* e *K*, podem variar dentro de uma

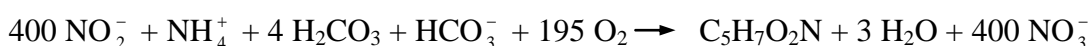
espécie e estão sujeitos a modificação. Micro-organismos r-estrategistas apresentam taxas de crescimento específico maiores, entretanto, com menor afinidade pelo substrato (maiores valores de K_s). Micro-organismos K-estrategistas apresentam crescimento mais lento, porém têm maior afinidade pelo substrato (menores valores de K_s). Portanto, com base nesse modelo, espécies de *Nitrosospira* e *Nitrospira* são consideradas K-estrategistas, enquanto que as espécies de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, r-estrategistas.

Em geral, o processo de nitrificação biológica ocorre segundo as equações estequiométricas referentes aos dois estágios do processo de conversão da amônia a nitrato, a saber (AHN, 2006):

Oxidação de N-amoniacal por bactérias oxidadoras de amônia ou AOB:



Oxidação de nitrito por bactérias oxidadoras de nitrito ou NOB:



Equação estequiométrica global para a completa oxidação de amônia a nitrato, incluindo a síntese celular:



Devido à quantidade de energia relativamente pequena obtida a partir da oxidação de NH_4^+ e NO_2^- , bactérias nitrificantes se reproduzem muito lentamente. Geralmente, estas bactérias representam menos de 10% da população bacteriana em sistemas de lodos ativados (GERARDI, 2006). Sob condições ótimas, o tempo de geração de bactérias nitrificantes é de aproximadamente 8-10 horas e sob condições não ideais, o tempo de geração é de aproximadamente 2-3 dias. Assim, tempos de retenção de sólidos (TRS) relativamente altos são requeridos para estabelecer uma população de bactérias nitrificantes capaz de promover efetiva nitrificação.

3.1.2.1 Nitrificação heterotrófica

A nitrificação heterotrófica pode ser realizada por vários membros filogenéticos de bactérias e fungos que podem oxidar íon amônio ou reduzir nitrogênio a partir de compostos orgânicos a hidroxilamina, nitrito e nitrato. Estudos feitos com *Paracoccus denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas putida* e outras bactérias revelaram que esses micro-organismos são capazes de oxidar íon amônio a nitrito. Em algumas bactérias, tais como *P. denitrificans*, a atividade nitrificante heterotrófica está ligada à atividade desnitrificante (HAYATSU *et al.*, 2008). Um grande número de micro-organismos heterotróficos é capaz de converter nitrito a nitrato, tais como as bactérias *Bacillus baldius* e *Burkholderia cepacia* e várias espécies de fungos como *Aspergillus wentii* e *Penicillium* spp. (HAYATSU *et al.*, 2008). Segundo os autores, a contribuição de heterotróficos na nitrificação em solos tem sido reconhecida e acredita-se que, sob condições desfavoráveis para bactérias nitrificantes autotróficas (por exemplo, forte acidez do solo), os micro-organismos nitrificantes heterotróficos efetivamente contribuam para a atividade nitrificante.

3.1.2.2 Nitrificação desnitrificante

Algumas espécies de *Nitrosomonas* podem nitrificar e desnitrificar simultaneamente sob condições óxicas ou anóxicas, liberando óxido nitroso (N₂O) ou nitrogênio gasoso (N₂) como produto final. Por exemplo, *Nitrosomonas eutropha* é uma bactéria nitrificante quimiolitototrófica obrigatória e também um organismo desnitrificante, que utiliza H₂ como doador de elétrons e NO₂⁻ comoceptor final. *N. europaea* também produz N₂O por desnitrificação (AHN, 2006). Acredita-se que o processo seja universal em AOB e contribui para produção de N₂O em solos. O mecanismo da produção de N₂ não está completamente esclarecido (HAYATSU, 2008).

Segundo Hayatsu (2008), há três hipóteses que explicariam a ocorrência de desnitrificação em AOB: o NO₂⁻ seria umceptor de elétrons alternativo para AOB obter energia para o seu crescimento em ambientes com baixa concentração de O₂; a utilização de NO₂⁻ seria uma estratégia para remover o substrato de NOB, reduzindo assim a competição com NOB por O₂; finalmente, o processo seria realizado para proteger as células de AOB dos efeitos do NO₂⁻ produzido durante a oxidação da amônia.

Desnitrificação também já foi observada em NOB. Várias amostras de *Nitrobacter* são capazes de utilizar NO_3^- como acceptor final de elétrons sob condições anóxicas (SHMIDT *et al.*, 2003).

3.1.2.3 Nitrificação em arqueias

Arqueias oxidadoras de amônia (AOA – *Ammonia- Oxidizing Archaea*) foram isoladas pela primeira vez de um aquário de água salgada, tendo sido demonstrado seu crescimento quimiolitotrófico a partir da oxidação aeróbia de amônia a nitrito. Membro do *Crenarchaeota* (Domínio *Archaea*), o micro-organismo foi identificado como *Nitrosopumilus maritimus*, (KONNEKE *et al.*, 2005). Esse micro-organismo também cresce utilizando CO_2 como fonte única de carbono como ocorre em bactérias nitrificantes. Estudos da presença de genes de *Archaea* envolvidos na oxidação da amônia assim como isolamento de outras arqueias marinhas nitrificantes têm revelado que *Crenarchaeota* marinhos desempenham papel mais dominante que as bactérias nitrificantes no ciclo do nitrogênio em oceanos (MADIGAN *et al.*, 2010).

Vários trabalhos têm detectado AOA em sistemas de tratamento de águas residuárias e em ambientes eutrofizados numa proporção bem menor que de AOB (PARK *et al.*, 2006; WELLS *et al.*, 2009; WEI *et al.*, 2011; YAPSAKLI *et al.*, 2011). Entretanto, Bai *et al.* (2012), investigando as abundâncias de AOA e AOB em 6 sistemas de tratamento de águas residuárias (3 de efluentes industriais e 3 de efluentes domésticos), encontraram que genes de *amoA*-AOA eram mais abundantes que genes de *amoA*-AOB em sistemas de tratamento doméstico, o que pode ser um indicativo de que AOA pode ter contribuição importante na oxidação de amônia, o que necessita de mais estudos.

3.1.3 **Oxidação anaeróbia da amônia – processo Anammox**

Até a década de 90 apenas processos aeróbios eram discutidos para a oxidação da amônia. Entretanto, Mulder *et al.* (1995) observaram a perda de amônia em um reator desnitrificante de leito fluidizado aplicado ao tratamento de efluentes de um reator metanogênico, que foi operado para degradação de resíduos de uma indústria de fermento na Holanda. Esse novo processo, no qual a amônia é oxidada anaerobiamente, foi denominado de Anammox (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) e é mediado por bactérias do filo *Planctomycetes*, ordem *Brocadiales* (HARHANGI *et al.*, 2011). Essas bactérias utilizam CO_2 como fonte de carbono, amônia como doador de elétrons e nitrito como acceptor final de elétrons, apresentando

crescimento muito lento (em torno de 11 dias; VAN DER STAR *et al.*, 2007). Este é um caminho metabólico diferente que combina a oxidação de íon amônio e redução de nitrito a nitrato em um único processo (etapa 8 da Figura 5.1). Bactérias anammox ainda não foram isoladas em culturas puras, sendo detectadas por meio de métodos moleculares. Tais métodos têm revelado a presença significativa de populações de anammox em sistemas de tratamento de esgotos, ecossistemas aquáticos, etc., distribuídas dentro de cinco gêneros: *Brocadia*, *Anammoxoglobus*, *Kuenenia*, *Jettenia* e *Scalindua*. Os quatro primeiros são frequentemente encontrados em sistemas de águas residuárias e o último, até o momento, foi encontrado em ambientes naturais de água doce e marinha (HARHANGI *et al.*, 2011).

3.1.4 Desnitrificação

É um processo alternativo de micro-organismos respirarem sob condições limitadas de O₂ ou mesmo anóxicas, utilizando compostos nitrogenados inorgânicos como aceptores finais de elétrons. É uma das principais fontes de emissões de NO (óxido nítrico) e N₂O na atmosfera (JETTEN, 2008). O processo pode ser desenvolvido por várias bactérias quimiorganotróficas, litoautotróficas, fototróficas e alguns fungos. Desnitrificantes autotróficos utilizam compostos de enxofre, hidrogênio, amônia ou nitrito como aceptores de elétrons (AHN, 2006).

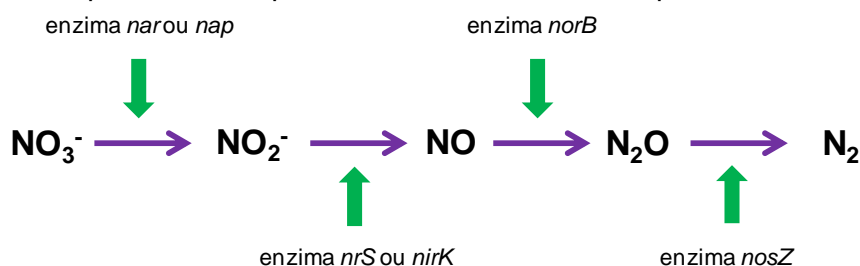
A maioria das desnitrificantes são bactérias anaeróbias facultativas heterotróficas, que podem utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos (na forma de DBO solúvel), como doadores de elétrons para obtenção de energia e fontes de carbono, inclusive aqueles encontrados em águas residuárias. Apresentam rápido crescimento, sendo que a maioria com tempo de duplicação celular de aproximadamente 15 a 30 minutos. Sob condições anóxicas, as enzimas necessárias para o uso de NO₃⁻ ou NO₂⁻ são rapidamente formadas. Em sistemas de lodos ativados, essas bactérias estão presentes em bilhões por grama de partícula de floco e representam aproximadamente 80% de todas as bactérias floculadas e dispersas (GERARDI, 2006).

Usualmente, as atividades das enzimas envolvidas no processo são inibidas na presença de O₂ e a expressão dos genes que codificam as enzimas é suprimida. Contudo, alguns estudos têm mostrado que várias bactérias, tais como *Paracoccus denitrificans*, podem desnitrificar mesmo na presença de O₂ (AHN *et al.*, 2006; HAYATSU *et al.*, 2008). Estas bactérias têm sido isoladas de diversos ambientes naturais e antrópicos com flutuações óxicas-anóxicas, indicando que desnitrificação aeróbia seria uma adaptação a estas condições e que tais

bactérias podem estar amplamente distribuídas nos mais diversos ambientes (HAYATSU *et al.*, 2008).

Durante o processo de desnitrificação, NO_3^- é reduzido sequencialmente a NO_2^- , NO , N_2O e N_2 . Várias enzimas redutases estão envolvidas na cadeia respiratória da desnitrificação, incluindo redutase de nitrato (*nar* ou *nap*), redutase de nitrito (*nirS* ou *nirK*), redutase de óxido nítrico (*norB*) e redutase de óxido nitroso (*nosZ*), conforme mostrado na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Esquema das etapas e enzimas envolvidas no processo de desnitrificação



A redução de nitrato a nitrito pode ser catalisada por dois tipos de redutases: *nar* ou *nap*. É o primeiro passo do processo, entretanto não é único para desnitrificação (JONES *et al.*, 2008). A redução de nitrito a óxido nítrico é mediada pela nitrito redutase, um processo-chave na desnitrificação. Duas enzimas funcionalmente equivalentes são conhecidas: *nirS*, contendo citocromo cd_1 , e *nirK*, contendo cobre; entretanto, desnitrificantes só possuem uma das enzimas. Óxido nítrico é posteriormente reduzido a óxido nitroso por óxido nítrico redutases *cNor* ou *qNor*, codificadas por duas variantes do mesmo gene (*norB*) (JONES *et al.*, 2008). A redução de óxido nitroso a N_2 é a última etapa da desnitrificação e é catalisada pela óxido nitroso redutase, codificada pelo gene *nosZ*. Contudo, algumas desnitrificantes não têm a enzima, não sendo capazes de realizar a redução completa a N_2 . Os genes *nirK*, *nirS* e *nosZ* têm sido os mais amplamente utilizados para análise da diversidade e quantificação de bactérias desnitrificantes (YOSHIDA *et al.*, 2010).

Em aplicações agrícolas, a desnitrificação é um processo prejudicial, uma vez que é a causa de perdas de fertilizantes nitrogenados na agricultura. Além disso, o gás N_2O produzido durante a redução de NO_3^- está envolvido na destruição da camada de ozônio (ENWAL *et al.*, 2005). No tratamento de esgotos, no entanto, a desnitrificação é benéfica, uma vez que reduz a carga de NO_3^- dos efluentes, diminuindo ou evitando o crescimento excessivo de cianobactérias e consequente eutrofização de corpos receptores.

O grupo das desnitrificantes inclui bactérias distribuídas em mais de 50 gêneros (ENWALL *et al.*, 2005) e a maioria corresponde a membros filogenéticos de *Proteobacteria*. Gêneros mais comuns de desnitrificantes são *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Thiobacillus* e *Bacillus*. Algumas arqueias halofílicas do gênero *Halobacterium* também são capazes de desnitrificar (RITTMAN & MC CARTY, 2001). Muitas bactérias desnitrificantes também reduzem anaerobiamente outros aceptores de elétrons como ferro férrico (Fe^{3+}) e alguns aceptores orgânicos (MADIGAN *et al.*, 2010).

As bactérias desnitrificantes são geralmente heterotróficas, contudo, diversas bactérias, dentre elas os gêneros *Pseudomonas*, *Paracoccus* e *Ralstonia*, são quimiolitotróficos facultativos, capazes de crescer na ausência de matéria orgânica, utilizando hidrogênio molecular (H_2) como doador de elétrons e CO_2 como fonte de carbono inorgânico (MADIGAN *et al.*, 2010). Esses micro-organismos podem alternar entre o metabolismo quimiolitotrófico ou quimiorganotrófico, dependendo das condições nutricionais de seus habitats. *Thiobacillus denitrificans*, por outro lado, é um exemplo de quimiolitotrófico obrigatório, pois utiliza somente compostos inorgânicos como doadores de elétrons para obtenção de energia (H_2S , S^0 , $S_2O_3^{2-}$, etc.) e CO_2 como fonte de carbono (MADIGAN *et al.*, 2010). Outros desnitrificantes autotróficos podem utilizar amônia como acceptor final de elétrons (AHN *et al.*, 2006).

A Tabela 3.1 sumariza os principais processos biológicos do ciclo do nitrogênio, bem como alguns exemplos de procariontes envolvidos.

Tabela 3.1– Processos essenciais e exemplos de procariontes no ciclo do nitrogênio

Processos	Exemplos de micro-organismos
Fixação de N_2 ($N_2 + 8H \rightarrow NH_3 + H_2$)	
- De vida livre	
Aeróbios	<i>Azobacter</i> , cianobactérias
Anaeróbios	<i>Clostridium</i> , bactérias púrpuras e verdes
- Simbióticos	<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Frankia</i>
Amonificação (N orgânico $\rightarrow NH_4^+$)	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>
Nitrificação ($NH_4^+ \rightarrow NO_3^-$)	
- Nitritação ($NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$)	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosospira</i> , <i>Nitrosococcus</i> , <i>Nitrosolobus</i>
- Nitratção ($NO_2^- \rightarrow NO_3^-$)	<i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Nitrospina</i> , <i>Nitrococcus</i>
Desnitrificação ($NO_3^- \rightarrow N_2$)	<i>Bacillus</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bradyrhizobium</i>
Anammox ($NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2 H_2O$)	<i>Brocadia</i> , <i>Kuenenia</i> , <i>Jettenia</i> , <i>Anammoxoglobus</i> , <i>Scalindua</i> .

Fonte: adaptado de Madigan *et al.* (2010)

3.2 Remoção biológica de nitrogênio em sistemas de tratamento de águas residuárias – Sistema UASB-filtro biológico percolador

Nos últimos anos, vários modelos de processos de eliminação de compostos nitrogenados têm sido desenvolvidos, focados em custo-benefício e baseados em nitrificação parcial (a amônia ionizada é convertida a nitrito, evitando a formação de nitrato), desnitrificação nitrificante ou sistemas combinados com anammox. A proposta desses processos, em geral, é promover a interação de bactérias nitrificantes aeróbias, bactérias anammox e/ou desnitrificantes sob condições limitadas de oxigênio com potencial para fazer uma remoção quase completa de amônia e carbono orgânico a N_2 e CO_2 (AHN, 2006; LAN *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2014).

No Brasil, o emprego de filtros biológicos percoladores com biofilme para o pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios, particularmente reatores UASB, tem sido uma estratégia promissora para remoção de matéria orgânica carbonácea residual e amônia em águas residuárias (ALMEIDA, 2012). O sistema UASB-filtro biológico percolador apresenta inúmeras vantagens associadas em relação a outros processos de tratamento de águas residuárias. Primeiro, reatores UASB, como são processos anaeróbios, apresentam baixa produção de lodo, além de apresentarem baixa demanda de área, simplicidade operacional. A tecnologia tem grande aplicabilidade em países de clima quente, principalmente considerando o contexto dos países em desenvolvimento.

O uso de filtro biológico percolador (FBP) como uma unidade de pós-tratamento faz-se necessário, uma vez que reatores UASB dificilmente são capazes de atender aos padrões de lançamento preconizados pelas legislações ambientais vigentes para remoção de matéria orgânica, nutrientes e organismos patogênicos (CHERNICHARO *et al.* 2001). Como se trata de um processo aeróbio, as vantagens associadas ao FBP em relação a outros são: a não necessidade de aeração mecanizada, baixo consumo energético, menor complexidade em termos de equipamentos, culminando, conseqüentemente, em maior simplicidade operacional e de manutenção.

Os filtros biológicos percoladores são sistemas aeróbios, preenchidos com material grosseiro (pedras, britas, escória de alto-forno ripas ou material plástico), sobre os quais efluentes são aplicados. Micro-organismos, oriundos da própria água residuária, desenvolvem-se de forma aderida ao material de preenchimento ou meio-suporte. O líquido escoar rapidamente de forma descendente pelo meio-suporte, entretanto a matéria orgânica é adsorvida e degradada pela

película microbiana (VON SPERLING, 2005). No caso de FBPs pós-reator UASB, a quantidade de matéria orgânica por unidade de volume de filtro, em termos de DBO, é baixa, o que favorece o desenvolvimento de micro-organismos nitrificantes, em detrimento dos heterotróficos, e estimula a remoção de íon amônio por nitrificação. Uma das principais limitações associadas aos FBPs pós-reator UASB é a dificuldade de controle da idade do lodo, que, por sua vez, dificulta a manutenção de populações microbianas de baixo crescimento no reator, como é o caso de micro-organismos nitrificantes.

A investigação sobre o comportamento dos parâmetros físico-químicos e da microbiota presente no biofilme, que afetam o processo de nitrificação em filtros biológicos percoladores, é de grande relevância para a melhor compreensão e identificação dos principais fatores que influenciam a remoção de N-NH_4^+ nesses sistemas.

Na literatura, há poucos estudos microbiológicos com filtros biológicos percoladores de baixa carga em comparação àqueles com sistema de lodos ativados ou outros processos biotecnológicos de remoção de compostos nitrogenados. Especificamente com FBPs utilizados no pós-tratamento de efluentes de reator UASB (ALMEIDA *et al.*, 2008), destaca-se o de Missagia (2010), que avaliou a influência das condições ambientais proporcionadas por diferentes tipos de meio-suporte em FBPs (escória de alto-forno, anéis plásticos, aparas de conduíte e espuma de poliuretano denominada de *Downflow Hanging Sponge* ou DHS), utilizados no pós-tratamento de efluente de reator UASB, sobre a abundância e distribuição de bactérias nitrificantes e de bactérias em geral. A microbiota foi analisada em diferentes profundidades e em dois períodos de cargas orgânicas volumétricas (COV de 0,24 e de 0,38 kg de DBO/ $\text{m}^3 \cdot \text{d}$) sobre. Resultados de FISH e clonagem mostraram que, em todos os filtros, o topo apresentou maior diversidade de micro-organismos devido à maior disponibilidade de matéria orgânica (em termos de DBO) e oxigênio. Em todos os filtros, as determinações da quantidade de células bacterianas foram significativamente maiores na COV mais elevada enquanto houve significativo decréscimo na quantidade de nitrificantes, o que foi comprovado pela menor remoção de íon amônio. Especificamente, com relação ao filtro preenchido com espuma de poliuretano (DHS), foi observado aumento significativo de nitrificantes (AOB+NOB) do topo para o fundo, coerente com o decréscimo das concentrações de DBO e amônia ao longo do filtro. Dentre os tipos de meio suporte, o DHS apresentou maior abundância de todos os micro-organismos investigados, bem como maior diversidade de morfotipos detectados por microscopia de contraste de fase.

Baseados em estudos de Almeida (2008) e de Missagia (2010), foram adotadas estratégias para aperfeiçoar o desempenho de FBP pós-reator UASB que incluíram o aumento da altura do compartimento reacional; a aplicação de uma COV abaixo de 0,25 kg DBO/ m³. d com o objetivo de reduzir a carga afluente de matéria orgânica para propiciar o desenvolvimento de bactérias nitrificantes, aumentando a nitrificação; e, finalmente, o uso de dois tipos diferentes de meio-suporte (um de placas de polietileno e outro essencialmente de espumas de poliuretano) para avaliar a influência de diferentes mecanismos de retenção de biomassa na remoção de nitrogênio.

Recentemente, Kubota *et al.* (2014), analisaram a composição da comunidade microbiana desenvolvida em reator preenchido com meio-suporte DHS e utilizado no pós-tratamento de efluente de reator UASB, em escala piloto, tratando esgoto municipal. As sequências genéticas, recuperadas por meio de clonagem, mostraram diferenças marcantes na composição da comunidade microbiana nas diferentes alturas e em diferentes estações. Os micro-organismos residentes predominantes nas partes superiores do reator foram responsáveis pela remoção de matéria orgânica, pois redução significativa de matéria orgânica foi observada. Quantificação de genes de *amoA*, específicos de AOB, revelaram que as proporções de oxidadores de amônia variaram ao longo da profundidade do reator, com mais AOB colonizando o meio e porções inferiores do reator que no topo.

3.3 Fatores interferentes no desenvolvimento e estabelecimento de nitrificantes em sistemas de tratamento biológico

A nitrificação é considerada a etapa limitante na conversão de íon amônio nos sistemas de tratamento biológico devido à baixa taxa de crescimento das bactérias nitrificantes, que, geralmente, são mais sensíveis à presença de compostos orgânicos inibitórios, metais pesados e altas concentrações de substratos (*apud* BASSIN *et al.*, 2012). Outros fatores, tais como oxigênio dissolvido (OD), temperatura, concentração de substrato e pH são os fatores ambientais-chave que controlam a nitrificação (FOCHT & VERSTRAETE, 1977; BAI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012). Dominância entre espécies e rendimento de biomassa são principalmente controlados por diferentes taxas de utilização de NH₄⁺ entre as espécies de AOB (LIMPIYAKORN *et al.*, 2007).

Vários aspectos ainda precisam ser investigados no processo biológico de conversão de íon amônio. Primeiro, os princípios ecológicos subjacentes às dinâmicas da comunidade de AOB

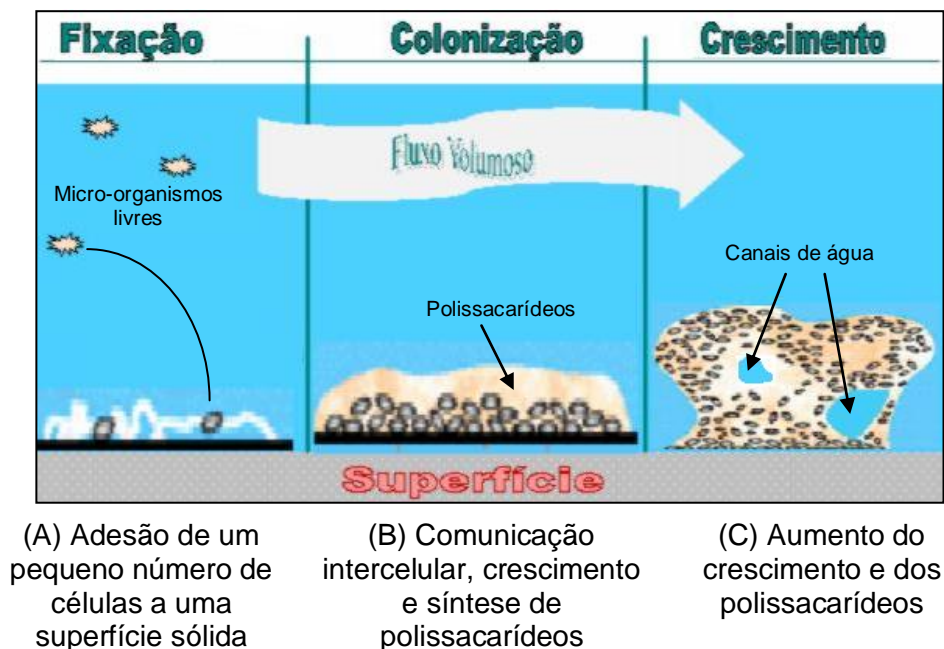
e a estabilidade da nitrificação e como eles se relacionam ainda são pobremente compreendidos (WANG *et al.*, 2012). Segundo, estudos recentes têm comprovado a existência de outros grupos microbianos envolvidos na oxidação de íon amônio nos mais variados ambientes, tais como arqueias oxidadoras de amônia (AOA) e anammox (AHN, 2006; BAI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012).

3.3.1 Mecanismos de retenção de micro-organismos em filtros biológicos percoladores

3.3.1.1 Adesão superficial – biofilmes

Como dito anteriormente, os FBPs de configuração tradicional são preenchidos com material grosseiro e o principal mecanismo de retenção de micro-organismos é por meio de biofilmes. Biofilmes são organizações de células microbianas aderidas a uma superfície, envoltas por uma matriz adesiva excretada pelas células. A matriz geralmente é um mistura de polissacarídeos ou substâncias poliméricas extracelulares (EPS), podendo conter proteínas e ácidos nucleicos (Figura 3.3). Os biofilmes aprisionam os nutrientes necessários ao crescimento microbiano e ajudam a impedir o descolamento das células de superfícies presentes em sistemas de fluxo de corrente (MADIGAN *et al.*, 2010).

Figura 3.3 – Formação e estrutura de um biofilme



Fonte: adaptado de Madigan *et al.* (2010)

A vida em biofilmes confere diversas vantagens às populações microbianas, dentre elas: mecanismos de autodefesa, resistência às forças físicas que poderiam remover as células não

aderidas, aumentando a possibilidade de sobrevivência das células. Além disso, os biofilmes fixam as células microbianas em um nicho favorável, por exemplo, em superfícies onde os nutrientes são mais abundantes ou constantemente repostos. Como consequência, as quantidades e atividades microbianas são normalmente bastante elevadas nas superfícies (MADIGAN *et al.*, 2010).

Entretanto, no caso dos FBPs, o crescimento de biofilmes nos meios-suportes tradicionalmente utilizados é limitado, uma vez que o fluxo do meio líquido promove o descolamento dos micro-organismos, além da biomassa estar mais suscetível à ação de predadores.

3.3.1.2 Retenção intersticial – espumas de poliuretano

A formação de biofilme em espumas de poliuretano é um método de imobilização de células microbianas utilizadas em um grande número de processos biotecnológicos. Este tipo de material promove maior retenção de biomassa e diversas condições ambientais, contribuindo para o aumento da nitrificação (ALMEIDA *et al.*, 2008; TANDUKAR *et al.*, 2006; DANIEL *et al.*, 2009). A vantagem do uso desse meio-suporte é a aderência, seleção e sustentação de micro-organismos de crescimento lento, tais como AOB, além de promover a desnitrificação. Na literatura já é bem-compreendido e comprovado que a espuma de poliuretano é uma estratégia promissora no processo de nitrificação-desnitrificação no pós-tratamento de efluentes (DANIEL *et al.*, 2009).

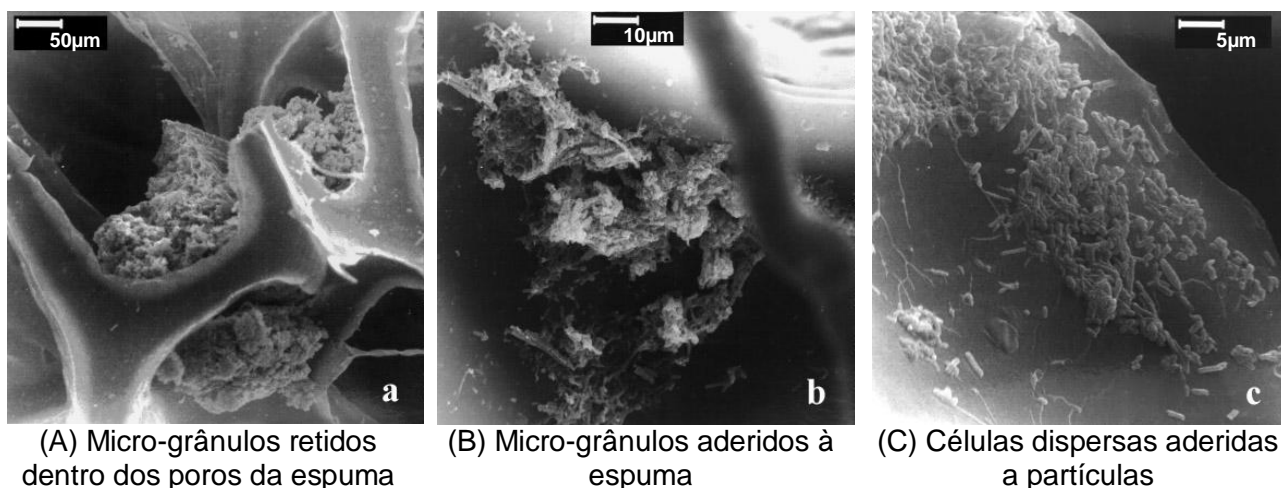
Chen *et al.* (2009) descreveram um processo biotecnológico conhecido como SNAD (*Simultaneous Nitrification, Anammox and Denitrification*). Segundo os autores, o processo tem altos potenciais de remoção de nitrogênio (70% de remoção de nitrogênio total; 74% de remoção de amônia) e de DQO (94% de eficiência), ocorrendo em um só reator, sendo a maioria da amônia removida por bactérias anammox. A proposta desse processo foi promover a interação de nitrificantes aeróbias, anammox e desnitrificantes sob condições limitadas de oxigênio com potencial para fazer remoção quase completa de amônia e carbono orgânico a N₂ e CO₂. Contudo, as condições ótimas para o enriquecimento de micro-organismos e detalhes dos mecanismos intrínsecos ao processo SNAD ainda não são bem-compreendidos (LAN *et al.*, 2011).

Woznica *et al.* (2010) exploraram a organização espacial de biofilmes nitrificantes desenvolvidos em espumas de poliuretano. Os biofilmes foram desenvolvidos em reatores em escala de bancada, inoculados com lodo de sistema de lodos ativados e alimentados com efluente sintético. Os autores analisaram a microbiota por meio de tomografia de raio X, microscopia de eletrônica de varredura e microscopia eletrônica confocal laser combinada com hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Vários modos de ligação das células microbianas à espuma foram mostrados, basicamente em três padrões distintos: (1) grandes agregados irregulares e camadas de biofilme na superfície da espuma; (2) agregados esféricos localizados na superfície externa do biofilme, compreendendo AOB em maior quantidade e NOB em pequenas quantidades (identificadas por meio de hibridização *in situ* fluorescente); (3) porções finas de biofilme aderidas à espuma.

Varesche *et al.* (1997), analisaram a imobilização de lodo em matrizes cúbicas de espuma, que preenchem um reator anaeróbio em escala de bancada, alimentado com efluente à base de glicose. Os autores também observaram três tipos distintos de organização da biomassa (Figura 3.4): (A) micro-grânulos mecanicamente retidos dentro dos poros da espuma, (B) micro-grânulos aderidos à espuma e (C) células dispersas aderidas a partículas. Tais observações estruturais foram semelhantes às descritas por Woznica *et al.* (2010). A adsorção bacteriana depende de forças elétricas entre a célula e a superfície do substrato, forças de Van der Waals e ligação química (hidrofóbicas e iônicas), sendo predominantes aquelas que conduzem à atração entre as superfícies. Entretanto, vários estudos, citados por Varesche *et al.* (1997), mostraram que a retenção de biomassa em meios-suportes de espuma é predominantemente física (mecânica), nos quais micro-colônias ficam retidas dentro dos poros deste material.

A conformação espacial dos micro-organismos dentro das espumas de poliuretano não apresenta uma estrutura bem-definida (como visto, por exemplo, em grânulos anaeróbios; VARESCHE *et al.*, 1997). A estruturação dos micro-organismos otimiza a conversão de substratos e a transferência de produtos metabólicos entre as espécies. Contudo, o alcance desta estruturação é lento, resultando em longos períodos de partida dos reatores. Em espumas de poliuretano, entretanto, esta conformação é rapidamente atingida por causa do baixo nível de organização microbiana necessária em tal meio-suporte.

Figura 3.4 – Imagens de imobilização de biomassa em meio-suporte de espuma



Fonte: Varesche *et al.* (1997)

Variações e mudanças nas condições ambientais dentro de espumas de poliuretano, tais como teor de matéria orgânica, concentrações oxigênio e nitrogênio podem afetar a composição da comunidade microbiana e da matriz de polímeros extracelulares do biofilme. Pouco ainda é conhecido sobre a identidade e o papel dos micro-organismos desenvolvidos em meios-suportes de espuma, que são de grande interesse para engenheiros e microbiologistas (KUBOTA *et al.*, 2014).

3.3.2 Influência da carga orgânica

Desde a década de 1970, estações de tratamento de águas residuárias têm combinado a oxidação de matéria orgânica carbonácea e nitrificação em um mesmo reator, entretanto, sabe-se que bactérias nitrificantes competem por O₂ e espaço com heterotróficas, particularmente em biofilmes (AHN, 2006). Nos casos em que as COV aplicadas variam consideravelmente ao longo do ano, a estabilidade dos FBPs pode depender de estratégias operacionais como a recirculação do efluente final, que pode aumentar as eficiências de remoção de N-NH₄⁺ em aproximadamente 20% (ALMEIDA, 2012).

A atividade de AOB e NOB variam segundo o ambiente no qual ocorre o fenômeno (KOOPS & POMMERENING-RÖSER, 2001; ROWAN *et al.*, 2003). Para que a nitrificação ocorra com boa eficiência é necessário que a concentração de matéria orgânica seja mínima, pois bactérias heterotróficas e bactérias autotróficas nitrificantes competem por O₂, o aceptor de elétrons comum para ambos os grupos (OKABE *et al.*, 1995). A competição entre bactérias heterotróficas e nitrificantes por substratos (oxigênio e amônia) e por espaço nos biofilmes

tem grande importância prática, sendo alvo de muitas investigações. A competição em biofilmes pode resultar na formação de estruturas estratificadas, na qual bactérias heterotróficas com crescimento mais rápido localizam-se em camadas mais externas, onde a concentração de substratos é maior, enquanto que bactérias nitrificantes, de crescimento lento tendem a localizar-se mais profundamente no biofilme. Por esta localização espacial, a atividade das nitrificantes pode ser limitada pela concentração de oxigênio no interior do biofilme (OKABE *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 1994).

O processo de nitrificação, portanto, é dependente da carga orgânica aplicada ao reator: sob alta carga orgânica, a maior parte do oxigênio que se difunde no biofilme é utilizada por bactérias heterotróficas para oxidação da matéria orgânica. Por isso, é importante que a carga orgânica aplicada e a aeração do sistema sejam controladas (< 12 mg/ L de DBO solúvel, Tabela 5.2) a fim de favorecer o desempenho da biomassa nitrificante em detrimento da atividade heterotrófica.

Missagia (2010), em concordância com vários trabalhos na literatura, observou forte correlação entre o aumento da COV e as abundâncias de bactérias heterotróficas e nitrificantes verificadas em FBPs utilizados no pós-tratamento de efluentes de reator UASB, demonstrando que a atividade das bactérias nitrificantes foi fortemente influenciada pelas mudanças de carga ocorridas sazonalmente pelas águas residuárias.

Apesar da competição comumente observada entre AOB e heterotróficas, outros trabalhos apontam que a coexistência entre esses micro-organismos nos sistemas de tratamento pode significar uma possível relação sintrófica entre os grupos (RACZ *et al.*, 2010). Jones e Hood (1980) observaram que a oxidação de $N-NH_4^+$ por *Nitrosomonas* spp. aumentou 150% quando cultivada com bactérias heterotróficas. As bactérias heterotróficas foram identificadas como *Nocardia atlantica* e *Pseudomonas* sp, cujo crescimento na presença de AOB também foi estimulado (uma ordem de magnitude). Neste trabalho, foi visto que ambas as bactérias, heterotróficas e autotróficas, parecem se beneficiar em culturas mistas, ao longo do tempo, chegando a concentrações similares às aquelas encontradas no ambiente (no caso, estuarino; 10^2 células/mL). Uma vez que várias vitaminas, aminoácidos e outros compostos orgânicos estimulam o crescimento de AOB, os autores especularam que provavelmente as heterotróficas teriam produzido um ou mais desses substratos, estimulando o crescimento de

AOB. Por outro lado, uma vez que AOB são fixadores de carbono inorgânico, estas podem ter liberado carbono orgânico, o que teria mantido o crescimento das bactérias heterotróficas.

3.3.3 Competição por oxigênio

As razões para o baixo nível de competitividade de bactérias nitrificantes com heterotróficas são o seu lento crescimento e os altos valores de K_m para o oxigênio (16 mM para espécies de *Nitrosomonas*, 62 mM para espécies de *Nitrobacter* e 1 mM para a maioria do heterotróficos) (BELSIER, 1979).

A competição por oxigênio não se limita apenas com as bactérias heterotróficas. Na literatura, é amplamente reportado o efeito do OD na competição entre linhagens de AOB. Por exemplo, Park e Noguera (2004) observaram que a concentração de OD exerce uma pressão seletiva significativa nas comunidades de AOB ao invés de promover a adaptação de AOB generalistas em sistemas de lodos ativados em escala plena e em reatores em escala de bancada. Avaliando o efeito do OD sobre comunidades de AOB em reatores em escala de bancada, os autores observaram que o reator com altas concentrações de OD (8,5 mg/L) foi dominado por linhagens de *Nitrosomonas oligotropha*, semelhantes ao lodo de inóculo (que continha também *N. communis*). Variação populacional ocorreu no reator com baixas concentrações de OD (0,12-0,24 mg/L), levando a emergência de linhagens relacionadas a *N. europaea*, sem no entanto, afetar a nitrificação. Os clones relacionados a *N. europaea* recuperados do reator com baixo OD, no entanto, eram de 2 *clusters* diferentes. No mesmo estudo, foram analisadas as comunidades de AOB de dois sistemas em escala plena (um com 0,2 a 0,8 mg/L e o outro com 0,6 a 7,4 mg/L) e foi observado que concentrações abaixo de 1mg/L de OD favoreceram o estabelecimento de uma população relacionada com *N. europaea*.

Em estudos com biofilme removendo fosfato de um reator em batelada, em escala laboratorial, Gieseke *et al.* (2001), observaram que membros da linhagem de *Nitrosomonas europaea* e *Nitrosomonas oligotropha* dominaram as camadas externas do biofilme onde as concentrações de OD eram mais altas, enquanto que membros de *N. oligotropha* exclusivamente dominaram as camadas mais internas, nas quais a concentração de OD era menor. Os autores especularam que a coexistência de linhagens de AOB relacionadas a *Nitrosomonas mobilis* e *N. europaea/ eutropha* em seções limitadas por OD no biofilme poderia indicar uma associação sintrófica entre estes tipos de AOB, na qual linhagens de *N. mobilis* teriam uma afinidade mais alta por oxigênio, enquanto que *N. europaea/ eutropha*

usariam preferencialmente nitrito como acceptor final de elétrons, como demonstrado para algumas amostras sob condições limitadas de OD (GIESEKE *et al.*, 2003).

Outros trabalhos, no entanto, especularam a existência de AOB generalistas em sedimentos oxigenados por raízes em *wetlands* (BODELIER *et al.*, 1996). A ausência de alterações nos perfis de DGGE mostrou que a estrutura da comunidade de AOB foi semelhante ao longo do tempo (KOWALCHUK *et al.*, 1998), o que sugeriu uma adaptação das espécies já presentes a baixas concentrações de OD. O número e as atividades nitrificantes foram positivamente correlacionados. AOB generalistas apresentariam vantagens competitivas em relação a outras, por serem capazes de conservar a capacidade nitrificante durante períodos anóxicos e hábeis em reagir instaneamente à presença de oxigênio em ambientes com flutuações óxicas e anóxicas, tais como a rizosfera de plantas. Entretanto, os autores não excluíram a possibilidade de que outros organismos, tais como nitrificantes do grupo *Gammaproteobacteria* ou nitrificantes heterotróficas, serem responsáveis pelas flutuações sazonais no potencial das atividades de oxidação da amônia (KOWALCHUK *et al.*, 1998). Lembrando que nessa época, pouco se sabia sobre bactérias anammox (descritas em 1995) e ainda não eram conhecidas as arqueias oxidadoras de amônia, as quais já foram encontradas recentemente em rizosfera de macrófitas de *wetlands* (WEI *et al.*, 2011).

Com relação à competição por oxigênio entre nitrificantes oxidadoras de NO_2^- e oxidadoras de NH_4^+ , estudos têm mostrado que as primeiras são mais sensíveis a limitações de oxigênio que as outras, uma vez que NOB têm menor afinidade pelo oxigênio que AOB (BELSER, 1979; HANAKI *et al.*, 1990b; SCHRAMM *et al.*, 1999). Sabendo-se dos diferentes requisitos de O_2 por AOB e NOB, uma estratégia muito utilizada em processos biológicos de remoção de nitrogênio, tais como CANON e SHARON, é o controle das concentrações de OD, de tal forma a minimizar o crescimento de NOB e promover diferentes níveis de acúmulo de NO_2^- , que pode ser reduzido a N_2 por bactérias desnitrificantes, anammox ou até por algumas linhagens de *Nitrosomonas* sp. As vantagens incluem um requisito menor de oxigênio (25% menor), um menor consumo de carbono orgânico na desnitrificação (40% menos) e baixa produção de lodo (BOUGARD *et al.*, 2006).

Em relação à competição entre as linhagens de NOB em sistemas de tratamento de efluentes, diversos trabalhos na literatura têm mostrado que os gêneros tipicamente encontrados são *Nitrospira* e *Nitrobacter*, sendo que o primeiro é o predominante em sistemas de tratamento

de águas residuárias. *Nitrospira* são K-estrategistas e estão bem adaptadas a baixas concentrações de nitrito e oxigênio, enquanto que *Nitrobacter* são r-estrategistas e, por isso, somente se proliferam em altas concentrações de nitrito e oxigênio (SCHRAMM *et al.*, 1999).

3.3.4 Competição por íon amônio

Além de ser substrato para nitrificação, o íon amônio é a fonte inorgânica de nitrogênio preferencialmente utilizada pelos micro-organismos, uma vez que já se encontra no estado de oxidação (-3) utilizado dentro das células. Contudo, quando o NH_4^+ não está disponível para síntese, muitos micro-organismos podem utilizar, como alternativa, formas oxidadas de nitrogênio, tais como NO_3^- , NO_2^- e N_2 . Quando uma forma oxidada de nitrogênio é utilizada, os micro-organismos devem reduzi-lo ao estado de oxidação (-3) do íon NH_4^+ , processo que requer elétrons e fonte de energia (RITTMAN & MC CARTY, 2001).

Hanaki *et al.* (1990a) examinaram o efeito da atividade de bactérias heterotróficas sobre a atividade de nitrificantes em reatores em escala de bancada alimentados com várias concentrações de glicose e 80 mg/L de N-NH_4^+ como fonte de nitrogênio. Segundo os autores, ambos os processos, assimilação e oxidação, contribuem para a remoção de N-NH_4^+ . A assimilação de íon amônio por heterotróficos foi proporcional à DQO consumida e significativamente reduziu a disponibilidade desse substrato para nitrificação. A assimilação de íon amônio ocorreu preferencialmente à nitrificação e somente o excedente foi consumido pelo último processo.

Bassin *et al.* (2012), analisando reatores sequenciais nitrificantes em batelada, alimentados com efluente sintético com diferentes concentrações de sais, observaram perdas de nitrogênio da ordem de 12 a 14%, dos quais 5 a 8% podem ter sido utilizados no crescimento da biomassa.

Segundo alguns autores, o destino do íon amônio no ambiente depende da relação C/N. Numa razão crítica, as bactérias heterotróficas podem consumir todo o nitrogênio mineral presente no sistema para assimilação de material celular. Razões inferiores ao valor crítico, com quantidades limitadas de carbono orgânico, os dois organismos competidores devem coexistir em situações *steady-state* (estáveis) (VERHAGEN *et al.*, 1991). No caso de sistemas de tratamento biológico, no qual o carbono orgânico é representado pela DBO, razões de DBO/N entre 5 e 10 parecem ser favoráveis ao processo de nitrificação (Tabela 5.2).

Com relação à nitrificação heterotrófica, pouco tem se discutido na literatura sobre sua relação com sistemas nitrificantes. Por exemplo, *Arthrobacter* sp. é um micro-organismo envolvido na nitrificação heterotrófica, capaz de oxidar íon amônio a hidroxilamina, ácido hidroxiâmico e nitrito (VERSTRAETE & ALEXANDER, 1972). Um micro-organismo relacionado a *Arthrobacter soli* foi recentemente encontrado por Bassin *et al.* (2012) em reatores sequenciais em batelada nitrificantes, alimentados com efluente sintético com diferentes concentrações de sais. Sabe-se que várias substâncias orgânicas e inorgânicas podem ser utilizadas como fonte de nitrogênio para nitrificação heterotrófica, sendo necessária uma fonte de carbono orgânico para o crescimento desses micro-organismos.

Desde a descoberta das arqueias oxidadoras de amônia (AOA), sua presença também tem sido amplamente investigada em sistemas de tratamento de efluentes. Park *et al.* (2006) detectaram genes *amoA* de AOA em biorreatores de lodos ativados utilizados para remoção de amônia, com baixos níveis de OD e longo TDH. Todas as sequências recuperadas mostraram similaridade com outras previamente encontradas em solos e sedimentos. Entretanto, a contribuição de AOA na oxidação da amônia em sistemas de tratamento de águas residuárias ainda é desconhecida. Alguns estudos sugerem que a abundância relativa de AOA é muito pequena em relação a AOB em sistemas de tratamento de lixiviado (0,03 a 0,04% de AOA e 1,0 a 2,3% de AOB dos genes totais; YAPSAKLI *et al.*, 2011), assim como na rizosfera de macrófitas aquáticas de um reservatório eutrofizado (razão número de cópias de *amoA*-AOB / *amoA*-AOA variou de 1,36 a 41,90, WEI *et al.*, 2012).

Controversamente, Bai *et al.* (2012) encontraram resultados que sugerem a importância de AOA na nitrificação em sistemas de tratamento de efluentes domésticos. Os autores encontraram, por PCR em tempo real, maiores abundâncias relativas de genes *amoA* de AOA ($6,3 \times 10^5$ a $4,5 \times 10^6$ cópias de gene *amoA* de AOA/ g contra $7,2 \times 10^3$ a $1,7 \times 10^5$ cópias de gene *amoA* de AOB/ g de peso seco de lodo ativado ou biofilme) em três sistemas tratando efluente doméstico, enquanto que as abundâncias de genes *amoA* de AOB foram maiores nos outros três sistemas tratando efluente tipicamente industrial ($5,7$ a $9,6 \times 10^3$ cópias de gene *amoA* de AOA/ g contra $2,6 \times 10^7$ a $3,6 \times 10^9$ cópias de gene *amoA* de AOB/ g de peso seco de lodo ativado ou biofilme). Os autores acreditam que as características do efluente, ao invés do processo de tratamento, constituem o fator-chave na distribuição e abundância de AOA, sendo que estas parecem ser mais frágeis que AOB.

Outro grupo que pode contribuir para o consumo de íon amônio em sistemas de tratamento biológico é o das bactérias anammox. O cultivo de anammox é vantajoso em relação a AOB, por não necessitar de fornecimento de oxigênio, pois o aceptor final de elétrons é o nitrito, que é reduzido a N_2 , sendo assim possível a remoção simultânea de amônia e nitrito, sem necessitar das etapas de oxidação do nitrito e desnitrificação. A desvantagem do processo é o lento crescimento das bactérias anammox (em torno de 7 a 11 dias; VAN DER STAR *et al.*, 2007). Entretanto, na literatura, é possível encontrar a descrição de consórcios entre AOB e anammox (AHN, 2006). Em determinadas proporções e níveis de oxigênio, as AOB podem ser competidoras pelo $N-NH_4^+$ com anammox ou podem estabelecer uma relação sintrófica.

Em consórcios de AOB e anammox, normalmente, 55 a 60% da amônia é convertida a nitrito por bactérias do tipo *Nitrosomonas* (AHN, 2006). O restante da amônia e o nitrito produzido servem de substratos para o processo Anammox. As águas residuárias afluentes devem conter altos níveis de $N-NH_4^+$ (acima de 0,5 g/L). Os processos de nitrificação parcial e Anammox podem ser desenvolvidos em compartimentos separados ou num só reator, como no caso do processo CANON. Neste, condições limitadas de oxigênio (abaixo de 0,5% de ar saturado) são fornecidas de tal forma que o ambiente é adequado para a interação estável entre micro-organismos aeróbios do tipo *Nitrosomonas* e bactérias do tipo *Planctomycetes* (AHN, 2006).

Alguns trabalhos na literatura apontam a ocorrência de bactérias anammox em processos de tratamento de efluentes com meio-suporte de espumas de poliuretano (CHEN *et al.*, 2009). Com o desenvolvimento e acúmulo de biomassa, o oxigênio pode ser totalmente consumido em determinadas microrregiões, levando ao surgimento de micro-nichos anóxicos, apropriados para o desenvolvimento de bactérias anammox. As implicações deste fenômeno sobre a comunidade de AOB, tais como prevalência de micro-organismos, competição por íon amônio têm sido muito pouco exploradas na literatura.

Outros trabalhos relatam a ocorrência de bactérias anammox simultaneamente com AOB em sistemas de tratamento de lixiviado em escala plena (YAPSAKLI *et al.*, 2011). Por PCR em tempo real, os autores encontraram que as porcentagens de genes *amoA*-AOB em relação a genes de RNAr 16S de bactérias totais variaram de 1,0 a 2,3%, enquanto que os genes de anammox variaram de 0,14 a 0,19%. O autores esperavam encontrar alta concentração de bactérias anammox pelo fato de haver baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de amônia no lixiviado, entretanto, os altos conteúdos de matéria orgânica encontrados nos

compartimentos do sistema de tratamento (médias de 620 a 2871 mg/L de DBO) podem ter inibido o desenvolvimento desses micro-organismos.

Entre as linhagens de AOB, sabe-se que a ocorrência de dominância de espécies e o rendimento de biomassa são controlados principalmente por diferentes taxas de utilização de amônia e oxigênio. Por exemplo, *Nitrosomonas europaea* possui valores altos de K_s (0,42-0,85 mg de $N-NH_4^+$ /L; KOOPS & POMMERINING-ROSER, 2001) e menor afinidade por amônia em relação às outras espécies de AOB. Assim, linhagens relacionadas a esta espécie parecem preferir ambientes eutróficos, ricos em $N-NH_4^+$. *Nitrosomonas oligotropha* têm menores valores de K_s (0,027-0,059 mg/L; KOOPS & POMMERINING-ROSER, 2001) e, portanto, maiores afinidades pelo substrato, sendo conhecidas AOB presentes em sedimentos de água doce, solos e efluentes com baixas concentrações de amônia.

Frequentemente, *Nitrosomonas* são encontradas em ambientes ricos em nitrogênio, tais como ETEs (GEETS *et al.*, 2006). Analisando a rizosfera de macrófitas aquáticas de um reservatório eutrófico, Wei *et al.* (2012) encontraram tipos filogenéticos de AOB relacionados a *N. ureae*, que são adaptadas a ambientes ricos em íon amônio. As linhagens eram semelhantes a aquelas encontradas em ETEs. As análises filogenéticas revelaram que a concentração de $N-NH_4^+$ na coluna d'água pode ter influenciado na distribuição dos micro-organismos oxidadores de amônia (WEI *et al.*, 2011).

Por exemplo, *Nitrosomonas europaea*, que é normalmente encontrada em habitats altamente eutrofizados, pareceu dominar a comunidade de AOB no topo do filtro, mas desapareceu no fundo, onde as concentrações de amônia eram menores. Por outro lado, *Nitrosomonas oligotropha* era mais abundante nos níveis mais baixos do filtro. Além disso, a população de AOB parece mudar ao longo do tempo, uma vez que a mesma estação foi investigada anos mais tarde e *Nitrosomonas europaea* não foi mais detectada pela sonda de FISH (LYDMARK *et al.*, 2006).

Conforme observado em diversos trabalhos, em geral, membro de *clusters* de *Nitrosopira* spp. e/ou *Nitrosomonas oligotropha* são AOB dominantes em ambientes com baixa concentração de $N-NH_4^+$, enquanto que *clusters* de *Nitrosomonas europaea* e *Nitrosococcus mobilis* predominam em ambientes ricos em íon amônio (LIMPIYAKORN *et al.*, 2005). Efeitos de outros fatores, além de íon amônio ou espécies individuais de AOB em sistemas de tratamento ainda são pouco compreendidos.

3.3.5 Influência da alcalinidade

A manutenção de níveis adequados de alcalinidade no sistema de tratamento (50 mg/L de CaCO₃, Tabela 5.2) é fundamental para garantir carbono inorgânico para a síntese de micro-organismos nitrificantes e para a neutralização de íons H⁺ gerados na nitrificação. De acordo com equações de oxidação e síntese celular utilizando medidas representativas de consumo de oxigênio e rendimento de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (AHN, 2006), as taxas de consumo de O₂ de AOB e NOB são, respectivamente, 3,16 mg de O₂/ mg de N-NH₄⁺ oxidado e 1,11 mg de O₂/ mg de N-NO₂⁻ oxidado. A quantidade de alcalinidade, em termos de CaCO₃, requerida por mg de N-NH₄⁺ oxidado é de 7,07 mg (AHN, 2006). Diminuição severa do pH pode ocorrer quando a alcalinidade da água residuária é reduzida em virtude da produção de ácidos durante o processo de nitrificação. A redução de pH para menos de 7 provoca a rápida diminuição das taxas de reação da nitrificação. Dessa forma, para evitar o prejuízo do processo, alcalinidade apropriada deve ser suplementada por adição química, por exemplo, com cal (AHN, 2006).

A Tabela 3.2 sumariza os principais fatores ambientais que influenciam na nitrificação. Os FBPs empregados no estudo foram dimensionados para atender os requisitos mínimos para favorecimento da nitrificação, particularmente, em termos de concentrações de matéria orgânica, N-amoniacal e alcalinidade carbonato.

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

Fator Interveniante	Implicações recorrentes
<p>Concentração de OD (interior do reator)</p> <p>Requisitos de O₂ (fase gasosa) Nitrificação: > 1,8 mgO₂/L. Ocorrência de acúmulo de nitrito: < 0,5 mgO₂/L. *Não computados os requisitos de O₂ para biomassa heterotrófica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Micro-organismos nitrificantes são estritamente aeróbios e possuem elevada afinidade por oxigênio. Caso o oxigênio não seja suficiente para atender aos requisitos da biomassa heterotrófica e nitrificante a taxa de remoção de amônia decresce em função da competição por oxigênio, predominantemente capturado pela biomassa heterotrófica nas porções externas do biofilme. • A baixa disponibilidade de OD exerce maior impacto sobre o crescimento de oxidadoras de nitrito, podendo resultar em acúmulo de nitrito no sistema.
<p>pH e alcalinidade</p> <p>pH ótimo para nitrificação: <i>em biofilmes: 7,5-8,5.</i></p> <p>Alcalinidade <u>residual</u> mínima para nitrificação em sistemas com biofilmes: > 45 mg/L (<i>observado</i>) 50 mg/L (<i>recomendado</i>).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A taxa de nitrificação declina substancialmente para valores de pH abaixo de 6,3-6,8. Baixos valores de pH podem ocasionar a formação de HNO₂ (inibidor da etapa de nitrificação) e indicam o aumento da concentração de íons de hidrogênio H⁺ e baixa alcalinidade residual. A inibição da atividade nitrificante com pH < 5,7 é também reportada. • Escassez de alcalinidade carbonato no sistema impede a síntese de micro-organismos nitrificantes por déficit de carbono inorgânico.

Fator Interveniente	Implicações recorrentes
<p>Temperatura</p> <p>Temperatura ótima para nitrificação: 28-36 °C (cultura pura).</p> <p>Taxas de crescimento específico (μ) variam em função da temperatura. A avaliação dos efeitos da temperatura no tratamento de esgotos apresenta complexidade em virtude dos demais fatores intervenientes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O metabolismo microbiano e a taxa de remoção de amônia podem diminuir em ambientes com temperaturas abaixo de 10 °C. Para filtros biológicos percoladores, com temperaturas do ar variando de 10°C para 20°C a taxa de nitrificação pode aumentar por um fator de 1,5. • Sistemas com elevadas taxas de nitrificação são mais afetados pela temperatura do que sistemas onde a taxa de nitrificação tende a ser menor. Fatores como disponibilidade de oxigênio, predadores, cargas orgânicas podem dificultar a avaliação do efeito da temperatura em sistemas de tratamento de esgotos.
<p>Concentrações de matéria orgânica</p> <p>DBO total > 20 mg/L (ou 30mgDQO_{solúvel}/L): Menores taxas de nitrificação em FBP.</p> <p>DBO solúvel < 12 mg/L: Favorável para ocorrência de nitrificação em FBPs.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Para elevadas concentrações de matéria orgânica, a nitrificação diminui pois a biomassa heterotrófica compete com sucesso por oxigênio e espaço, reduzindo a fração volumétrica de nitrificantes no biofilme. • Matéria orgânica solúvel: intensifica o crescimento de micro-organismos heterotróficos elevando espessura do biofilme, o que dificulta a transferência de substratos (O_2 e $N-NH_4^+$) para porções internas do biofilme. • Matéria orgânica particulada: uma vez adsorvida na superfície do biofilme pode proporcionar resistência à transferência de massa. Posteriormente, a hidrólise do componente particulado é um mecanismo que resulta em fonte adicional de substrato para a biomassa heterotrófica.
<p>Relação DBO/NTK</p> <p>DBO/NTK: 25</p> <p>Pouca disponibilidade de formas reduzidas de nitrogênio para nitrificação.</p> <p>DBO/NTK: 5-10</p> <p>Pode ser favorável ao processo de nitrificação, a depender das condições operacionais impostas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Maiores relações DBO/NTK favorecem a predominância da biomassa heterotrófica no biofilme em virtude da maior taxa de crescimento específico e fluxo de síntese observado para esses micro-organismos. Adicionalmente, a síntese da biomassa heterotrófica diminui a concentração de formas reduzidas de nitrogênio como a amônia. • A predominância de micro-organismos heterotróficos dificulta a transferência de substrato (N-amoniacoal e O_2) não permitindo a coexistência de micro-organismos nitrificantes e heterotróficos no biofilme para elevadas relações DBO/NTK.
<p>Compostos orgânicos e inorgânicos</p> <p>Sulfetos: 0,5 mg/L</p> <p>N-amoniacoal: 20mg/L</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nitrificantes são sensíveis a vários compostos orgânicos e inorgânicos. Na presença de tais compostos as taxas de nitrificação tendem a diminuir. • Concentrações de N-amoniacoal acima de 20 mg/L podem iniciar a inibição de micro-organismos oxidadores de nitrito.

Fonte: Almeida (2012)

No presente estudo, os FBPs foram projetados de forma a atender aos requisitos discriminados na Tabela 3.2, conforme detalhado por Almeida (2012). Entretanto, no que diz respeito às concentrações afluentes de sulfeto em efluentes de reatores UASB tratando esgotos sanitários, estas comumente estão entre 7 e 11 mg/L (SOUZA, 2010), concentrações

suficientes para inibir o crescimento de nitrificantes. Tais aspectos serão observados na discussão dos resultados de caracterização da comunidade bacteriana.

3.4 Biomassa e dinâmica de sólidos em FBPs

3.4.1 Distribuição da biomassa e dinâmica de sólidos em FBPs

Normalmente, o desenvolvimento da biomassa não é uniformemente distribuído ao longo da profundidade dos FBPs. Micro-organismos nitrificantes somente podem crescer quando seu substrato está disponível no afluente que percola o meio-suporte e variações diurnas de cargas e de temperatura podem resultar em falta de substratos na parte inferior dos FBPs. Predação e decaimento de biomassa também são fatores importantes que afetam o crescimento da biomassa (WIK, 2003; GUJER, 2009).

A produção de biomassa, bem como o acúmulo, em FBP terciários é bastante pequena em virtude da predação por organismos mais complexos. Invasões maciças de larvas de mosca (*Psychodidae*) e alguns vermes (*Naididae*) consomem a biomassa, reduzindo seriamente o desempenho da nitrificação em FBPs terciários por períodos prolongados. O problema pode ser superado com aumento do TDH no FBP, uma estratégia que causa custos extras, como consumo de energia (GUJER, 2009). Missagia (2010) observou organismos de diversas complexidades, principalmente no topo de FBPs utilizados no pós-tratamento de reator UASB. Tais organismos incluíam protozoários e nematódeos (*Diplogaster* sp.) que podem ter sido responsáveis pela menor diversidade de bactérias nesta porção dos reatores.

Estudos de Persson *et al.* (2002) mostraram que a quantidade de biomassa variou ao longo da profundidade dos FBPs. Os autores estudaram FBPs preenchidos com meio suporte plástico do tipo *crossflow* (fluxo cruzado), utilizados no tratamento de efluente municipal. A biomassa foi amostrada nas profundidades de 0,5, 3 e 5 m dos filtros, 3 períodos do ano de 1999 (abril, agosto e dezembro), correspondendo a diferentes condições operacionais ao longo do tempo. A quantidade de biofilme (em termos de peso seco) variou ao longo do ano e, geralmente, mostrou uma diminuição com a profundidade do FBP.

Grandes variações na quantidade de AOB foram observadas nas três ocasiões de amostragem. Eles observaram quantidade relativamente modesta de AOB uma vez que o peso seco foi muito baixo no fundo do FBPs. Em abril, a quantidade de AOB foi comparativamente baixa a 0,5 e 3 m e mesmo a proporção de AOB foi alta em 5 metros, a quantidade de AOB foi

relativamente modesta uma vez que o peso seco do biofilme era baixo no fundo. Condições antes da amostragem de abril: baixa carga de amônia e baixas temperaturas, que resultaram em pouca nitrificação. Em agosto as condições eram opostas e as quantidades de AOB estimadas foram as mais altas no topo do FBP, mas diminuíram acentuadamente com a profundidade. A mesma tendência de distribuição foi observada de AOB na FBP foram vistos nos resultados simulados. Os autores (PERSSON *et al.* 2002) especularam que durante condições favoráveis, grandes quantidades de AOB são esperadas nas partes superiores deixando apenas pequenas quantidades para sustentar populações de AOB nas partes inferiores. Inversamente, durante condições desfavoráveis, haverá menos AOB, porém uniformemente distribuídas ao longo do FBP.

3.4.2 Desenvolvimento de biomassa heterotrófica em biofilmes autotróficos

Vários trabalhos observaram que sistemas nitrificantes, primariamente considerados autotróficos por não fornecer nenhuma fonte de carbono orgânico, foram capazes de sustentar micro-organismos heterotróficos (KINDAICHI *et al.*, 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2010). A matéria orgânica necessária para a manutenção da biomassa heterotrófica originou-se de produtos microbianos solúveis, conhecidos como SMPs (*Soluble Microbial Products*), que foram liberados pela biomassa autotrófica durante metabolismo normal e no decaimento celular em culturas mistas. Entretanto, tais compostos são recalcitrantes e apresentam lenta biodegradabilidade em relação aos compostos orgânicos comumente encontrados em águas residuárias (NI *et al.*, 2011b). Mesmo assim, avaliações matemáticas de dados experimentais reportados na literatura indicaram que o crescimento heterotrófico em biofilmes nitrificantes (30 a 50%) e em grânulos (30%) foi significativamente maior que o do lodo nitrificante (15%) (NI *et al.*, 2011a).

Isto explicaria a baixa porcentagem de nitrificantes comumente encontradas em sistemas biológicos, sugerindo que outros micro-organismos heterotróficos estariam contribuindo para a remoção de $N-NH_4^+$. Tal constatação passa a ser ainda mais importante, considerando que efluentes de reatores UASB possuem maior percentual de SMPs (45 a 65%) do que o esgoto bruto (AQUINO *et al.*, 2009), sendo de menor biodegradabilidade. A influência do percentual de SMPs em efluentes de reatores biológicos na nitrificação e na comunidade microbiana desenvolvida em sistemas de pós-tratamento necessita ser melhor investigada.

3.5 Dinâmicas populacionais e abundâncias de micro-organismos nitrificantes em diversos sistemas de tratamento biológico

Segundo Rowan *et al.* (2003), diversos estudos sugerem que há diferenças ecológicas e fisiológicas entre AOB e grupos relacionados identificados a partir de técnicas de biologia molecular. Ambientes naturais, com baixas concentrações de amônia, parecem abrigar *Nitrosospira* spp., enquanto que em sistemas de tratamento predominam *Nitrosomonas* spp. *Nitrosospira* é um gênero conhecido de AOB predominante em solos de florestas, pastagens e ecossistemas agrícolas, podendo ser introduzidas em meio aquático por lixiviação do solo. Gênero *Nitrosococcus*, também já foi observado como uma das AOB predominantes (mais de 70% do total de AOB, junto com *Nitrosomonas*) em todos os reatores de bancada, com aeração intermitente e inoculados com biomassa de lodos ativados, utilizados no pós-tratamento de efluentes de suinocultura (oriundos de sistema anaeróbio) (MOTA *et al.*, 2005).

Com relação a sistemas de tratamento, na literatura há vários estudos de estrutura de comunidades em sistemas de lodos ativados tratando os mais diferentes tipos de resíduos. Segundo Wang *et al.* (2010), a falta de consenso no tipo específico de AOB predominante em ETE sugere que o tipo de água residuária, assim como as características da ETE tais como intensidade de aeração, configuração do reator, tempo de retenção de sólidos (TRS) e tempo de detenção hidráulica (TDH) podem estabelecer ambientes significativamente diferentes e, dessa forma, selecionar tipos diferentes de AOB (PARK & NOGUERA, 2004). Apesar dessas diferenças, de modo geral, o desempenho da nitrificação não é afetado por causa da redundância funcional entre as diferentes linhagens de AOB, ou seja, a presença de espécies reservatórias que podem desempenhar a mesma função ecológica (SIRIPONG & RITTMAN, 2007).

Sendo assim, a estabilidade funcional não está necessariamente ligada à estabilidade da comunidade de AOB. Em estudos com reatores em batelada sequenciais em escala de laboratório, Wittebolle *et al.* (2009) mostraram que a comunidade de AOB, analisada através de genes de RNAr 16S, mudou semanalmente a uma taxa de $13 \pm 5\%$ sem, no entanto, alterar a estabilidade funcional da nitrificação. Wells *et al.* (2009) observaram oscilações temporais nas populações de AOB em ETE em escala plena, enquanto que a nitrificação permaneceu estável.

Siripong & Rittman (2007) comprovaram a ocorrência de redundância funcional em processos de lodos ativados. Eles encontraram linhagens de AOB relacionadas às espécies de *Nitrosomonas europaea* e *N. eutropha*, *N. oligotropha*, *N. communis* e ao gênero *Nitrospira* em todas as estações de tratamento. Linhagens de *Nitrospira* e *Nitrobacter*, gêneros de NOB, coexistiram nos sistemas. Dentre os fatores que variaram, somente a temperatura sazonal influenciou na comunidade nitrificante, especialmente o balanço entre *Nitrospira* e *Nitrosomonas*. Mesmo assim, observou-se a coexistências dessas populações durante o verão e inverno.

Entretanto, isso não significa que alterações na comunidade microbiana sejam irrelevantes para a funcionalidade do sistema. Mudanças dramáticas podem acontecer na estrutura da comunidade microbiana e causar instabilidade funcional. Gentile *et al.* (2007) monitoraram dinâmicas na comunidade bacteriana em dois reatores desnitrificantes de crescimento disperso por cerca de meio ano e observaram que, durante o período de instabilidade funcional, com altas concentrações de NO_3^- efluente, a estrutura da comunidade mudou consideravelmente. Dinâmicas moderadas na comunidade microbiana, ao invés de abruptas, parecem ser adaptações nos ambientes e são importantes para o desempenho estável dos sistemas de tratamento de efluentes (WANG *et al.*, 2012).

Wang *et al.* (2012) analisaram, por meio de T-RFLP, as dinâmicas populacionais da comunidade de AOB de um sistema em escala piloto tratando esgoto sanitário durante um período de um ano. Com exceção dos primeiros 60 dias, o sistema apresentava nitrificação estável durante todo o ano monitorado. A comunidade de AOB era constituída por *clusters* relacionados a *Nitrosomonas europaea*, *N. oligotropha* e *N. communis*. Os autores observaram que a taxa média de mudança (a cada 15 dias) das estruturas da comunidade de AOB era de $10 \pm 8\%$. Correlações entre os perfis de T-RFLP e 10 parâmetros operacionais e ambientais foram testadas por análise de correlação canônica (*Canonical Correlation Analysis* – CCA) e teste de Mantel. Os resultados mostraram que as dinâmicas na comunidade de AOB correlacionaram-se mais fortemente com OD, amônia efluente, DBO efluente e temperatura, porém sem correlação estatisticamente significativa com a eficiência de remoção de amônia. As análises de CCA mostraram que 51% das variações foram explicadas por fatores operacionais e ambientais determinísticos e 49%, por causas desconhecidas (WANG *et al.*, 2012b).

3.5.1 Comunidades microbianas em sistemas de lodos ativados

Nielsen *et al.* (2010) propuseram um modelo conceitual de comunidades microbianas baseado na investigação microbiológica de 25 estações de lodos ativados na Dinamarca com ênfase na remoção biológica de fósforo. A maioria dos grupos bacterianos importantes envolvidos na nitrificação, desnitrificação, remoção de fósforo, fermentação e hidrólise foram identificados e quantificados usando métodos moleculares (FISH). Os autores observaram que um número limitado de espécies principais estava presente em todas as estações, constituindo cerca de 80% do total das comunidades, mostrando que as comunidades microbianas nos sistemas de tratamento biológico de remoção de fósforo são mais similares e não muito diversas como algumas vezes tem sido sugerido. Os autores revisaram o conhecimento atual sobre estes micro-organismos e relacionaram as principais rotas metabólicas do fluxo de carbono com substâncias orgânicas específicas, as populações dominantes envolvidas nas transformações, interações interespecies e fatores-chave que controlam sua presença e atividade.

Os autores acreditam que estações de tratamento biológico com ênfase na remoção de fósforo são um modelo perfeito e apropriado para estudos de ecologia microbiana em sistemas de tratamento de águas residuárias, uma vez que o sistema de tratamento é composto por unidades anaeróbias, anóxicas e aeróbias e que o modelo proposto poderia ser utilizado para testar teorias de ecossistema microbiano para o desenvolvimento de novos e aprimorados modelos quantitativos de ecossistemas, sendo benéfico para projeção futura e manutenção de sistemas de tratamento de efluentes.

A composição das comunidades microbianas foi determinada 2 a 4 vezes por ano (durante 3 anos) em cada planta utilizando 38 sondas de oligonucleotídeos de gêneros e espécies numericamente dominantes. Cada grupo funcional tinha tipicamente 3 a 7 espécies/gêneros em cada uma das 25 estações de tratamento. A sonda EUBmix detectou 60 a 90% de todas as bactérias presentes e 10 a 20% da comunidade microbiana era constituída por micro-organismos não-identificados.

Dentre os diversos grupos funcionais, bactérias nitrificantes constituíam cerca de 7% da comunidade microbiana total. No tanque aeróbio, especificamente, as nitrificantes consistiam de dois grupos: AOB, principalmente espécies relacionadas a *Nitrosomonas oligotropha* e *Nitrosospira* e NOB, quase que exclusivamente as linhagens 1 e 2 de *Nitrosospira*. Outras linhagens de AOB estavam ocasionalmente presentes, tais como *Nitrosococcus mobilis*.

Outras NOB, tais como *Nitrobacter*, *Nitrococcus* e *Nitrospina* não estavam presentes em números significantes nas estações. Ambos os grupos são tipicamente autotróficos, embora eles também sejam capazes de utilizar substratos orgânicos (crescimento mixotrófico) como fonte de carbono sob condições aeróbias ou anóxicas (NIELSEN *et al.*, 2010). Nenhuma AOA foi identificada nos sistemas e membros de *Planctomyces*, que inclui o grupo das bactérias anammox, não foram encontrados em números significantes.

3.5.2 Abundâncias relativas de AOB e NOB em sistemas nitrificantes

Em vários trabalhos na literatura, em diversos sistemas nitrificantes em escala plena, a porcentagem de nitrificantes é em torno de 10% da população total de bactérias (HARMS *et al.*, 2003; GEETS *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.* 2010; YAPSAKLI *et al.*, 2011). Por exemplo, Harms *et al.* (2003) observaram em um sistema de tratamento de esgoto municipal que as populações nitrificantes constituíam cerca de 12% da comunidade geral de bactérias, sendo 2,9% de AOB e 8,6% de NOB (baseado na quantificação de genes de RNAr 16S).

Yapsakli *et al.* (2011) identificaram e quantificaram por PCR em tempo real AOB, NOB, AOA e bactérias anammox em um sistema de tratamento de lixiviado em escala plena. Os resultados indicaram que todos esses micro-organismos coexistiram no sistema, porém a remoção de amônia foi atribuída principalmente à nitrificação. As populações de AOB (quantificação de genes *amoA*) e NOB (quantificação de genes de RNAr 16S de *Nitrobacter* sp. e *Nitrospira* sp.) compreendiam, respectivamente, 1,5% e 11,3% da comunidade de bactérias em geral. A quantidade estimada de *Nitrospira* sp. foi aproximadamente 20 vezes maior que a de *Nitrobacter* sp. Nos estudos de Limpiyakorn *et al.* (2005), as porcentagens de AOB em 12 sistemas de tratamento de esgoto municipal em escala plena variaram de 0,01 a 2,8% do total de bactérias. Variações sazonais foram observadas na comunidade de AOB, a estrutura parecia ser a mesma, porém o que variou foram as quantidades de AOB.

Alguns trabalhos, entretanto, apontam abundâncias de AOB relativamente altas. Análises de FISH realizadas por Persson *et al.* (2002) estimaram que as abundâncias de AOB nas 3 profundidades de FBPs tratando esgoto municipal eram em torno de 16-45% da comunidade total. Matsumoto *et al.* (2010) observaram, por FISH, que 60 e 10% da biomassa ativa de grânulos nitrificantes era constituída, respectivamente, por AOB e NOB. Kindaichi *et al.* (2004) observaram que AOB e NOB constituíam respectivamente 20 e 30% da biomassa ativa do biofilme estudado. Entretanto, os últimos sistemas eram escala de bancada e alimentados

com efluente sintético. Tais situações controladas poderiam favorecer o desenvolvimento de nitrificantes, particularmente de AOB.

Altas concentrações de NOB em relação a AOB têm sido encontradas em vários trabalhos na literatura. Baseado em análises de PCR em tempo real, Dionisi *et al.* (2002) e Harms *et al.* (2003) encontraram, respectivamente, 195 e 5 vezes mais células de *Nitrospira* sp. que de AOB em sistemas em escala plena tratando esgoto municipal. Kindaichi *et al.* (2006) encontraram números de *Nitrospira* sp. (por análises de FISH e PCR em tempo real) cerca de 2 a 3 vezes maiores que os de AOB numa situação de *steady-state*. Yapsakli *et al.* (2011) encontraram aproximadamente 10 vezes mais genes de RNAr 16S de *Nitrospira* que os genes de *amoA*. Os últimos autores acreditam que a dominância de espécies de *Nitrospira* sobre as de AOB pode ser um indicativo de que elas podem ter funções metabólicas além da oxidação de NO_2^- e mais investigações são necessárias para compreensão da discrepância entre o número de genes destas bactérias e suas funções conhecidas.

3.5.3 Quantificação de nitrificantes por PCR tempo real em diversos sistemas de tratamento

A distribuição e a frequência de micro-organismos estão intimamente relacionadas com suas funções ecológicas e com seu sucesso competitivo, daí a importância de sua quantificação e avaliação da influência de fatores abióticos, tais como estrutura espacial do habitat, temperatura e disponibilidade de nutrientes. A quantificação de determinados micro-organismos é um pré-requisito essencial para compreensão das relações funcionais e das dinâmicas populacionais nas comunidades microbianas. Esse conhecimento é valioso não só a partir de uma perspectiva de pesquisa fundamental, mas também por poder ajudar a aprimorar processos biotecnológicos como tratamento de águas residuárias, que dependem do bom funcionamento de complexas comunidades multi-específicas (DAIMS & WAGNER, 2007).

Para a quantificação de bactérias totais, AOB e NOB (*Nitrospira* sp. e *Nitrobacter* sp.), utilizou-se a técnica de PCR em tempo real, uma técnica de alta sensibilidade, que tem sido empregada há alguns anos em estudos de quantificação de micro-organismos em geral. Na literatura, há vários trabalhos de quantificação de bactérias totais, nitrificantes e/ou desnitrificantes por PCR em tempo real em sistemas de tratamento de resíduos, dentre eles: sistemas de tratamento de esgotos municipais e industriais (DIONISI *et al.*, 2002; GEETS *et al.*, 2007; FIGUEROLA & ERIJMAN, 2010), tratamento de lixiviados (YAPSAKLI *et al.*,

2011), em reatores tratando efluentes sintéticos (WITTEBOLLE *et al.*, 2008), em reatores em escala de bancada (GRAHAM, *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2010) e em solos (ENWALL *et al.*, 2005). Uma das vantagens é a possibilidade de quantificação de várias amostras ao mesmo tempo, utilizando-se uma curva-padrão de DNA de concentração conhecida.

O princípio da técnica é a quantificação dos fragmentos de DNA (*amplicons*) à medida que vão sendo sintetizados nas reações de PCR. O diferencial desta técnica para a PCR convencional é a presença de um corante fluorescente de DNA, denominado *SYBR Green I*, nos reagentes da reação. Após a adição do DNA da amostra desconhecida, moléculas do *SYBR Green I* ligam-se imediatamente nas duplas-fitas iniciais. Durante a PCR, a enzima *Taq* DNA polimerase amplifica a sequência do DNA-alvo e a cada fita-dupla de DNA recém-sintetizada, o corante se liga. Conforme a PCR progride, mais *amplicons* são gerados e o resultado é um aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de DNA sintetizado pela PCR. Quanto mais alto o número de cópias iniciais do DNA-alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência.

3.5.4 Uso de pirosequenciamento 454 em estudos de ecologia microbiana

A proliferação de projetos de sequenciamento de DNA em larga escala nos últimos anos tem impulsionado a busca de métodos alternativos para reduzir tempo e custo. O pirosequenciamento 454 é um método relativamente recente de sequenciamento massivo de DNA (MARGULIES *et al.*, 2005). O método tem sido utilizado intensivamente em pesquisas de ecologia microbiana nos mais diversos ambientes, inclusive em sistemas de tratamento de águas residuárias (KIM *et al.* 2012; LEE *et al.* 2012; WANG *et al.* 2012a; Yu *et al.* 2012; SHANKS *et al.* 2013; SERKEBAEVA *et al.* 2013). A técnica é capaz de sequenciar 25 milhões de bases, com 99 % precisão ou mais, em cerca de quatro horas (MARGULIES *et al.*, 2005). Segundo Xie *et al.* (2012), o pirosequenciamento 454 é uma ferramenta promissora para análise da diversidade microbiana em comparação com as metodologias convencionais, pois a técnica fornece uma visão aprofundada da estrutura e das dinâmicas das comunidades microbianas nos ecossistemas, o que ajuda a otimizar as condições de operação de sistemas de tratamento biológico. Além disso, populações bacterianas em baixa proporção (abundância) são detectadas.

Para análises de genomas inteiros é feita uma fragmentação do DNA em segmentos de fitas simples de cerca de 100 pares de bases (Figura 6.5). No caso da análise de diversas amostras,

por exemplo, estudo da comunidade de micro-organismos, é feita previamente uma PCR com iniciadores de interesse, sendo que um deles é marcado com um *barcode*. O *barcode* é uma sequência de cerca de 10 nucleotídeos, específica de cada amostra, o que permite posteriormente a identificação da origem das sequências amplificadas. Cada fragmento de DNA é, então, imobilizado em micro-esferas de emulsão, nas quais ocorre uma nova PCR e, no final do processo, haverá uma série de cópias idênticas ao fragmento inicial de DNA. As micro-esferas são, então, depositadas em uma placa de fibra óptica contendo mais de um milhão de poços; cada poço comporta apenas uma micro-esfera. Assim, como no sequenciamento tradicional, o pirosequenciamento 454 envolve a síntese de uma cadeia de DNA complementar pela enzima DNA polimerase. Os quatro nucleotídeos (A, T, G, C) são aplicados sobre a placa numa ordem fixa e as reações de sequenciamento ocorrem simultaneamente na placa inteira. Toda vez que um nucleotídeo é incorporado à fita complementar, há a liberação de uma molécula de pirofosfato, que fornece a energia necessária para liberação de luz pela enzima luciferase, também adicionada ao sistema. Cada pulso de luz sinaliza que a sequência em análise incorporou uma base complementar àquela presente no sítio de inserção da fita de DNA, registrando-se, assim, a identidade dos nucleotídeos (MADIGAN *et al.*, 2010).

A Tabela 3.3 apresenta alguns estudos de ecologia microbiana em diversos ambientes. Particularmente, em esgotos brutos e sistemas de tratamento anaeróbio, os filos predominantes são *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Chloroflexi*. Em ambientes de solo e alagadiços (tipo *wetlands*), observa-se também *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia* como filos predominantes.

Tabela 3.3 – Diversidade de *Bacteria* encontrada em vários ambientes e determinada por pirosequenciamento 454

Origem da amostra	OTUs encontradas (taxa mais abundantes)	Observações	Nº de sequências analisadas	Referência
Esgoto bruto de 13 estações de tratamento nos Estados Unidos	<i>Proteobacteria</i> (62,2%), <i>Firmicutes</i> (20,6%), <i>Bacteroidetes</i> (12,5%), <i>Actinobacteria</i> (1,7%), <i>Fusobacteria</i> (1,2%) <i>Proteobacteria: Gammaproteobacteria</i> (38,1%), <i>Betaproteobacteria</i> (18,7%), <i>Epsilonproteobacteria</i> (2,6%) , <i>Deltaproteobacteria</i> (1,6%), <i>Alphaproteobacteria</i> (1,1%)		380.175 sequências obtidas de 13 amostras. Seleção randômica de 17.000 sequências/ amostra	Shanks <i>et al.</i> 2013
Superfície de turfa de <i>wetlands</i> do norte da Rússia	Maior riqueza de filós raros. <i>Acidobacteria</i> (35,5%±2.4%), <i>Proteobacteria</i> (±29,6%), <i>Actinobacteria</i> (9,5%±2.0%), <i>Verrucomicrobia</i> (8,5%±1,4%), <i>Planctomycetes</i> (5.8%±0,4%). <i>Proteobacteria: Alphaproteobacteria</i> (15,9%±1,7%), <i>Deltaproteobacteria</i> (7,1%±0,4%), <i>Gammaproteobacteria</i> (6,6%±0,4%).	-Ambientes com taxas de acúmulo de carbono 10-30 g/m ² .ano (1/3 do <i>pool</i> de carbono), conhecidos como principal fonte de metano. -Contêm baixas concentrações de N, S e Fe, pH altamente ácido (abaixo de 4.0)	37.229 sequências com comprimento médio de 430pb obtidas de 8 amostras (média de 4.653 sequências/amostra). 27 filós e 1.269 OTUs	Serkebaeva <i>et al.</i> 2013
Subsuperfície de turfa de <i>wetlands</i> do norte da Rússia	<i>Acidobacteria</i> (39,2%±1,2%), <i>Proteobacteria</i> (±23,5%), <i>Actinobacteria</i> (10,7%±0,5%), <i>Planctomycetes</i> (9,7%±0,6%), <i>Verrucomicrobia</i> (0,6%±0,2%). <i>Proteobacteria: Alphaproteobacteria</i> (25,8%±1.4%), <i>Deltaproteobacteria</i> (4,4%±0,3%), <i>Gammaproteobacteria</i> (2,1%±0,1%)	- <i>Acidobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i> e <i>Planctomycetes</i> mostraram uma clara preferência de crescimento ou em condições óxicas ou anóxicas.		

Origem da amostra	OTUs encontradas (taxa mais abundantes)	Observações	Nº de sequências analisadas	Referência
14 sistemas de tratamento de esgoto na China	<i>Proteobacteria</i> (21 a 53%), <i>Bacteroidetes</i> (11 a 64%), <i>Acidobacteria</i> (1 a 27%), <i>Chloroflexi</i> (1 a 17%) <i>Proteobacteria: Betaproteobacteria</i> (21 a 52%), <i>Alphaproteobacteria</i> (7 a 97%), <i>Gammaproteobacteria</i> (8 a 34%), <i>Deltaproteobacteria</i> (2 a 18%)	Amostras coletadas no tanque de aeração de lodos ativados em escala plena	139.951 obtidas de 14 amostras.	Wang <i>et al.</i> 2012a
Reator anaeróbio de mistura completa em escala de bancada alimentado com efluente sintético contendo glicose	- Inóculo de digestor anaeróbio: <i>Proteobacteria</i> (32.8%), <i>Bacteroidetes</i> (21.8%), <i>Chloroflexi</i> (2.5%), <i>Sinergistetes</i> (1.8%), <i>Firmicutes</i> (1.0%), bactérias não-classificadas (38.2%) - Reator a 50°C: <i>Firmicutes</i> (85%), gênero predominante <i>Lactobacillus</i>	A produção de ácido láctico aumentou consideravelmente a partir dos 50°C.	10.597 sequências selecionadas a partir de 10 amostras (média de 1513 sequências/amostra)	Kim <i>et al.</i> 2012
7 digestores anaeróbios em escala plena	<i>Proteobacteria</i> (20.5%), <i>Bacteroidetes</i> (19.7%), <i>Firmicutes</i> (17.8%) e <i>Chloroflexi</i> (4.8%) Filo não-classificado foi o maior (28.4±15.4%) - Maior proporção de sequências dentro de <i>Firmicutes</i> nos digestores termofílicos (24.3±10.5%) que nos mesofílicos (12.6±5.0%). - Maior proporção de <i>Bacteroidetes</i> nos digestores mesofílicos (22.0±9.2%) que nos termofílicos (17.0±9.2%)	Variabilidade da comunidade bacteriana dentro dos digestores foi menor que entre digestores. Desempenho dos digestores e condições operacionais afetaram o perfil da comunidade bacteriana.	83.774 sequências (~487pb) a partir de 40 amostras (média de 2094 sequências/amostra); 9051 OTUs	Lee <i>et al.</i> 2012
<i>Wetlands</i> costeiras do estuário do Rio Amarelo (China)	<i>Proteobacteria</i> (40.45%), <i>Bacteroidetes</i> (23.54%), <i>Firmicutes</i> (9.01%), <i>Actinobacteria</i> (8.31%), <i>Acidobacteria</i> (1.74%), <i>Chloroflexi</i> (1.6%), <i>Verrucomicrobia</i> (0.21%)		57.684 sequências (≥ 200pb) a partir de 5 amostras (média de 11.537 sequências/amostra)	Yu <i>et al.</i> 2012

3.6 Avaliação de diferentes tipos de meio-suporte para retenção e desenvolvimento de biomassa nitrificante

Com relação a estudos microbiológicos com filtros biológicos percoladores encontrados na literatura, há pouco estudos (PERSSON *et al.* 1999; ROWAN *et al.*, 2003; JUHLER *et al.*, 2009; MISSAGIA, 2010; SUDARNO *et al.*, 2010) quando comparado àqueles com sistema de lodos ativados.

Especificamente com FBPs utilizados no pós-tratamento de efluentes de reator UASB (ALMEIDA *et al.*, 2008), Missagia (2010) avaliou a influência das condições ambientais proporcionadas por diferentes tipos de meio suporte (escória de alto-forno, anéis plásticos, aparas de conduíte e espuma de poliuretano denominada de *Downflow Hanging Sponge* ou DHS), profundidades distintas e duas diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV de 0,24 e de 0,38 kg de DBO/ m³.d) na abundância e distribuição de bactérias nitrificantes e na diversidade microbiana (Domínio *Bacteria*), assim como no desempenho do reator (remoção de N-NH₄⁺). Foi observado por análise microscópica e DGGE que em todos os filtros, o topo apresentou maior diversidade de micro-organismos devido à maior disponibilidade de matéria orgânica (em termos de DBO) e oxigênio. Por análise de FISH, observou-se que em todos os filtros, as contagens de bactérias totais foram significativamente maiores na COV mais elevada. A quantidade de nitrificantes sofreu redução, o que foi comprovado com a baixa remoção de N-NH₄⁺. Especificamente, com relação ao filtro preenchido com espuma de poliuretano (DHS), foi observado um aumento significativo de nitrificantes (AOB+NOB) do topo para o fundo, coerente com o decréscimo das concentrações de DBO e N-NH₄⁺ ao longo do filtro.

A pesquisadora concluiu que, apesar de os filtros terem sido alimentados com o mesmo efluente, as diferentes composições e configurações dos materiais de enchimento resultaram no desenvolvimento de diferentes condições ambientais, que favoreceram um estabelecimento diversificado de espécies. Dentre os tipos de meio suporte, o de espuma de poliuretano apresentou maior abundância de todos os micro-organismos investigados, bem como maior diversidade de morfotipos detectados por microscopia de contraste de fase.

Uma das principais limitações associadas aos FBPs é a dificuldade do controle da idade do lodo, o que, por sua vez, dificulta a manutenção de populações microbianas de baixo crescimento no reator, como é o caso de micro-organismos nitrificantes. Esse problema tem

sido resolvido com o uso de espumas de poliuretano como meio-suporte, uma vez que este tipo de material promove maior retenção de biomassa e diversas condições ambientais, contribuindo para o aumento da nitrificação (ALMEIDA *et al.*, 2008; TANDUKAR *et al.*, 2006; DANIEL *et al.*, 2009). A vantagem do uso desse meio suporte é a aderência, seleção e sustentação de micro-organismos de crescimento lento tais como AOB, além de promover a desnitrificação. Na literatura já é bem-compreendido e comprovado que a espuma de poliuretano é uma estratégia promissora no processo de nitrificação-desnitrificação no pós-tratamento de efluentes (TAWFIK *et al.*, 2006; DANIEL *et al.*, 2009; ALMEIDA, 2012). Segundo Machdar *et al.* (1997), o uso de espumas possibilita a retenção intersticial de biomassa (20 a 25g de ST/L), maior idade do lodo (> 100 dias) e um maior TDH (em torno de 2,5h).

O primeiro sistema descrito na literatura baseado em espumas de poliuretano utilizado no pós-tratamento de reator UASB foi o DHS (*Downflow Hanging Sponge*; MACHDAR *et al.*, 2000; TANDUKAR *et al.*, 2006; TAWFIK *et al.*, 2006). Experiências práticas mostraram que as remoções de DBO, DQO e N-NH₄⁺ no sistema UASB-DHS variaram em torno de 80 a 97%, 81 a 84% e 61 a 80% respectivamente, com baixas concentrações de sólidos suspensos no efluente final, mesmo sem o uso de decantadores secundários. Tandukar *et al.* (2007) especularam que a remoção de nitrogênio total nesse sistema foi predominantemente realizada por desnitrificação heterotrófica, assumindo que a assimilação de nitrogênio para síntese celular foi inexpressiva. A fonte adicional de carbono para a desnitrificação heterotrófica seriam os materiais intracelulares oriundos de células inativas. Entretanto, os resultados de Almeida (2012) com um FBP preenchido por espuma sugeriram que a remoção de nitrogênio total não poderia ser explicada somente por um processo biológico e que outros (tais como síntese celular e bactérias anammox) são possíveis fatores intervenientes.

Portanto, há pouca informação sobre a identidade e proporção de micro-organismos responsáveis por manter o processo de pós-tratamento de efluentes de reatores UASB. As condições ambientais promovidas por diferentes estratégias operacionais podem ser determinantes na seleção de micro-organismos especificamente mais adaptados às condições impostas, seja em meios suportes plásticos, onde a biomassa se desenvolve sobre uma superfície, ou em interstícios, como ocorre em meios essencialmente baseados em espumas de poliuretano.

3.7 Análises estatísticas

3.7.1 Índices de diversidade α

Os índices de diversidade, também denominados de medidas de diversidade α (alfa) ou índices de heterogeneidade, são valores obtidos a partir de expressões matemáticas e são principalmente utilizados em estudos ecológicos. Tais expressões levam em consideração tanto a uniformidade (equitabilidade) quanto a riqueza de espécies. O aumento do número de espécies ou da uniformidade das abundâncias aumenta a diversidade.

O índice de Simpson (1949) foi o primeiro a ser usado em estudos ecológicos e mostra a concentração de dominância (D). O índice varia de 0 a 1 e, quanto mais próximo de 1, maior a dominância por uma ou poucas espécies. Para cálculo do índice, utiliza-se a equação abaixo (3.1):

$$D = \sum_{i=1}^S \left[\frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \right] \quad (3.1)$$

Onde n_i é o número de indivíduos na espécie (ou OTU) i e N , o número total de indivíduos. Este índice exprime basicamente a abundância de espécies mais comuns, sendo conseqüentemente mais sensível a mudanças que ocorram nestas espécies (MAGURRAN, 1988). Uma vez que D aumenta, a diversidade diminui, para converter a probabilidade de Simpson numa medida de diversidade, determina-se o índice D' , que é $1 - D$.

Entretanto, o índice de diversidade mais utilizado em estudos ecológicos é o de Shannon (H'), procedente da teoria da informação. Este índice dá maior peso para espécies raras e é obtido pela seguinte equação (3.2):

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i \quad (3.2)$$

Onde S é o número de espécies (ou OTUs), p_i é a proporção da espécie (ou OTU) i , estimada como n_i/N . Na prática, o valor máximo de H' é $\ln S$.

Comparando-se os índices de Simpson e Shannon, o primeiro atribui maior peso às espécies (no caso, OTUs ou grupos taxonômicos) mais abundantes, sendo conseqüentemente mais sensível a mudanças que ocorrem nestes grupos, enquanto que o segundo é influenciado pela riqueza de espécies (MAGURRAN, 1988).

A equitabilidade, igualdade ou uniformidade refere-se ao padrão de distribuição de indivíduos entre as espécies, sendo proporcional a diversidade, exceto se houver co-dominância de espécie. Tais índices baseiam-se na relação entre a diversidade observada (H') e a diversidade máxima (H'_{max}), a qual seria possível numa situação em que todas as espécies fossem igualmente abundantes. O índice de equitabilidade mais amplamente utilizado é o de Pielou (J'), que consiste na razão do índice de Shannon (H') pelo logaritmo de S (número de espécies), com valores situando-se entre 0 e 1. Outro índice utilizado para avaliar a equitabilidade de uma amostra é o de Evenness, também chamado de índice de uniformidade de Sheldon (1969), obtido a partir da fórmula: $e^{H'/S}$.

O índice de Chao 1 estima a riqueza total utilizando o número de espécies representadas por apenas um indivíduo nas amostras (*singletons*), e o número de espécies com apenas dois indivíduos nas amostras (*doubletons*). A estimativa de riqueza é calculada pela equação 3.3:

$$S_c = s + \frac{F_1^2}{2F_2} \quad (3.3)$$

Onde S_c é a riqueza de espécies estimada, s é a riqueza observada, F_1 é o número de espécies *singletons* e F_2 é o número de *doubletons*.

3.7.2 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais ou *Principal Component Analysis* (PCA) é um procedimento da estatística multivariada que utiliza uma transformação ortogonal para converter um conjunto de observações de variáveis (possivelmente correlacionadas) a um conjunto de valores de variáveis linearmente descorrelacionadas, chamadas componentes principais. Após os dados serem devidamente padronizados, uma matriz de semelhança baseada em índices de correlação de *Pearson* é elaborada. A partir desta matriz, determinam-se os autovalores (valores próprios, *eigenvalues*) e autovetores (vetores próprios, *eigenvectors*), que são distribuídos num espaço multidimensional. Os indivíduos em estudo

são, então, projetados num espaço multidimensional, sem uma prévia hierarquia, baseando-se na co-variância ou na correlação de suas características. Os dados são transformados para um novo sistema de coordenadas, de forma que a maior variância por qualquer projeção fica ao longo da primeira coordenada (chamado primeiro componente – CP₁), a segunda maior variância fica ao longo da segunda coordenada (CP₂), e assim por diante.

O uso principal da PCA é a investigação e consequente descoberta de relações entre os dados sem explicação ou interpretação prévia (MARDIA,1979). Tais observações, previamente não esperadas, podem ser fundamentais para interpretação dos dados. Apesar de antigas, as análises multivariadas só puderam ser utilizadas rotineiramente e incorporadas às análises de dados apenas recentemente, devido ao desenvolvimento de processadores computacionais mais rápidos.

3.8 Análise crítica da literatura

Diversos estudos encontrados na literatura têm mostrado que uma comunidade microbiana estática não é essencial para manter a funcionalidade de um sistema biológico. A comunidade microbiana muda ao longo do tempo, emergindo populações que são mais adaptadas às condições impostas (por exemplo, diferentes concentrações de substratos).

A seleção de espécies microbianas é um fato comum durante o tratamento biológico, sendo governada principalmente pelas concentrações de substratos, tais como OD, NH₄⁺, NO₂⁻ e matéria orgânica. A configuração do reator é um fator importante na seleção de espécies no sentido de permitir ou não a mistura do líquido e homogeneização de nutrientes e na retenção e acúmulo dos micro-organismos na forma de grânulos, flocos ou biofilmes.

Ao se alterar as condições operacionais impostas, a nitrificação pode até ser parcialmente prejudicada, mas o processo logo é retomado por causa da seleção de espécies, que apresentam características que as permitem sobreviver às novas condições ambientais. Sistemas que possuem meios suportes com altos índices de vazios apresentam vantagem em relação aos convencionais, por terem espaço disponível e permitirem o desenvolvimento de micro-organismos mais lentos, que seriam “lavados” do sistema. Assim, estes tipos de meio-suporte podem contribuir para o aumento da eficiência de remoção de compostos nitrogenados.

Quando se trata de remoção de N-amoniaco em sistemas de tratamento biológico, comumente são estudadas as populações de AOB e NOB. A estrutura da comunidade nitrificante em sistemas de tratamento biológico, particularmente FBPs, parece estar relacionada principalmente a algumas populações de AOB relacionadas a *Nitrosomonas europaea*, *N. oligotropha* e *N. communis* e as de NOB, a *Nitrospira* e *Nitrobacter*. Sabendo-se que a comunidade nitrificante constitui uma pequena parcela da comunidade geral (até aproximadamente 10%), pouco se é discutido sobre o restante dos micro-organismos que compõe a comunidade geral e qual a influência destes na remoção de compostos nitrogenados.

Apesar de estudos recentes incluírem a investigação de micro-organismos anammox e AOA, seria importante a investigação de outros organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio, tais como nitrificantes heterotróficas e desnitrificantes que poderiam influenciar também na remoção de $N-NH_4^+$. Isto se torna mais importante quando se verifica que sistemas autotróficos também são capazes de desenvolver biomassa heterotrófica devido à liberação de SMPs. Considerando que os efluentes de reatores UASB possuem um percentual considerável de SMPs, é necessária uma investigação da comunidade microbiana geral, além da comunidade nitrificante, desenvolvida nos FBPs.

O uso de meios-suportes alternativos com elevado índices de vazios, tais como os de espumas de poliuretano, tem sido bem-sucedido em sistemas de tratamento biológico, especialmente para remoção de N-amoniaco. Entretanto, há pouca informação sobre a identidade e proporção de micro-organismos desenvolvidos neste tipo de meio-suporte e suas interações ecológicas. Esse conhecimento é essencial para a compreensão de relações funcionais e de processos biológicos que se desenvolvem dentro dos sistemas de tratamento biológico, especialmente FBPs, o que permitiria o seu aprimoramento, por exemplo, para a nitrificação e desnitrificação.

4 HIPÓTESES E PREMISSAS

A presente tese foi fundamentada considerando as seguintes hipóteses:

1- Apesar dos FBPs serem alimentados com o mesmo afluente, oriundo de um reator UASB, as comunidades bacterianas que se desenvolvem e se estabelecem em ambos os FBPs são diferentes.

***Premissa:** A configuração do reator é um dos fatores que influenciam no desenvolvimento da comunidade microbiana. Os meios-suportes têm configurações e características superficiais diferentes, propiciando diferentes condições ambientais em termos de acúmulo e retenção de substratos, disponibilidade de espaço para crescimento da biomassa, exposição ou não à luz, etc.*

2- O FBP preenchido por espuma apresenta maiores eficiências de remoção de matéria orgânica e de íon amônio devido à sua capacidade de reter maior quantidade de micro-organismos de crescimento lento, tais como as bactérias nitrificantes.

***Premissa:** As bactérias nitrificantes apresentam crescimento relativamente lento. Para promover a oxidação de $N-NH_4^+$, é necessário que tais bactérias encontrem condições ideais para o seu crescimento, com um TRS mais alto, o suficiente para o seu desenvolvimento. O uso de um meio-suporte que aumente o TRS dentro do sistema favorecerá o desenvolvimento de tais bactérias, impedindo que elas sejam “lavadas” do filtro.*

3- No FBP preenchido por espuma observa-se a ocorrência simultânea dos processos de nitrificação, desnitrificação e Anammox.

***Premissa:** Com o crescimento dos micro-organismos aeróbios ao longo do tempo no meio-suporte de espuma, o oxigênio disponível é totalmente consumido em algumas regiões do meio-suporte, originando nichos anóxicos. Estes nichos são ocupados por anaeróbios facultativos (desnitrificantes) e por anaeróbios obrigatórios (bactérias anammox).*

4- Mudanças na estrutura da comunidade bacteriana ocorrem ao longo da profundidade dos FBPs, apresentando diferenças consideráveis entre o topo e o fundo.

***Premissa:** As concentrações de substratos (matéria orgânica, OD, $N-NH_4^+$, $CaCO_3$) variam ao longo da profundidade de ambos os FBPs. Uma vez que a comunidade microbiana*

responde de acordo com a disponibilidade de substratos, essas variações influenciam na diversidade e abundância dos micro-organismos.

5- O aumento da carga orgânica aplicada nos FBPs entre os períodos monitorados provoca o aumento nas abundâncias de bactérias totais e a diminuição nas populações de nitrificantes, resultando em menor eficiência de remoção de íon amônio. Em caso de redução da carga orgânica, ocorre aumento nas populações de nitrificantes, aumentando as eficiências de remoção de N-NH_4^+ .

Premissa: *O aumento na concentração de matéria orgânica favorece o desenvolvimento de bactérias heterotróficas, pois estas apresentam uma taxa de crescimento mais rápida que as nitrificantes. Dessa forma, as bactérias heterotróficas ganham na competição por oxigênio e espaço, impedindo ou minimizando o desenvolvimento de nitrificantes.*

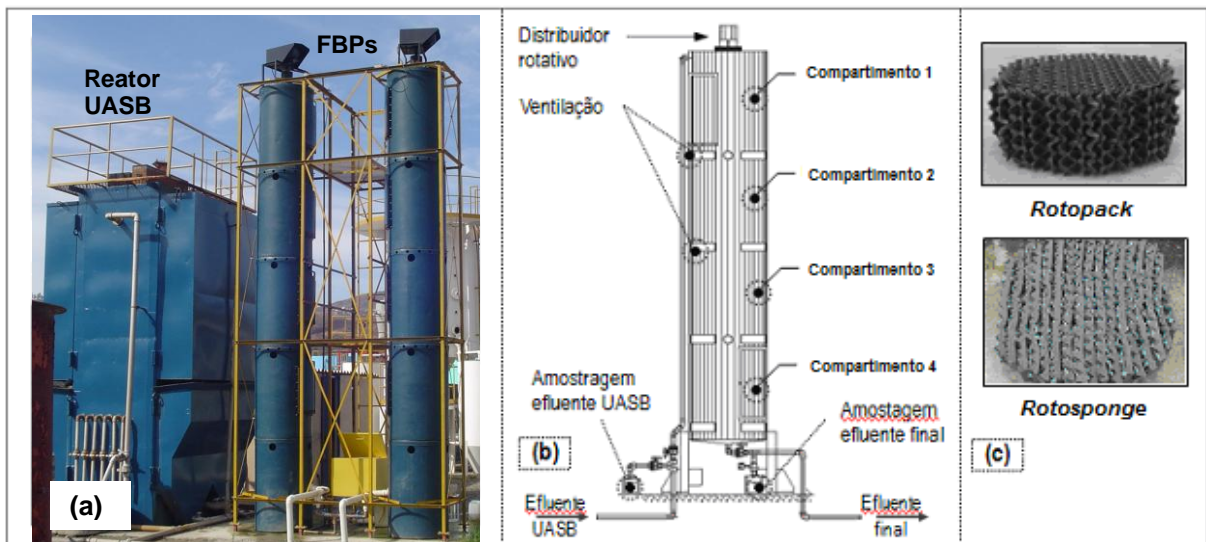
5 METODOLOGIA

5.1 Descrição do aparato experimental

O aparato experimental, dimensionado para tratar os efluentes de origem doméstica, compreendia um reator UASB e dois FBPs (Figura 5.1A). O sistema UASB/FBP foi alimentado com o esgoto bruto afluente a uma ETE (ETE ARRUDAS, localizada em Belo Horizonte- MG) em escala plena, após o esgoto passar pela etapa de gradeamento e desarenação. As principais características do sistema UASB/FBP são apresentadas na Tabela 5.1.

A operação do sistema UASB/FBP ocorreu sem unidades de decantação secundária, no transcurso de 524 dias operacionais. Ambos os FBPs não foram previamente inoculados com lodo, sendo que os micro-organismos que colonizaram os meio-suportes vieram da própria água residuária (efluente do reator UASB). O primeiro FBP a entrar em operação foi o preenchido por placas (Figura 5.1C). Após 152 dias de funcionamento deste FBP, iniciou-se a operação do FBP preenchido por espuma (Figura 5.1C).

Figura 5.1– Sistema UASB seguido por FBPs e materiais para retenção de biomassa



(A) Sistema UASB seguido por FBPs. (B) Representação esquemática dos FBPs e principais componentes. (C) Materiais de enchimento utilizados na pesquisa.

As características dos meios-suportes para retenção de biomassa de ambos os FBPs estão descritas na Tabela 5.1. Maiores detalhes dos FBPs pós-UASB são encontrados na tese de Almeida (2012).

Tabela 5.1– Principais características do sistema UASB/FBP

Características físicas e condições operacionais	Reator UASB	Filtro biológico percolador		Comentários sobre os materiais de enchimento
		FBP de placa	FBP de espuma	
Volume útil (m ³)	16,8	1,90	1,85	• <i>FBP de placa</i> : Constituído de placas corrugadas de polietileno. A biomassa se desenvolve sobre a superfície das placas, como em um típico sistema de biofilme.
Altura útil (m)	4,8	4,20	4,08	
Material de constituição	Aço	Polietileno	Polietileno	
Vazão média aduzida (m ³ /d)	45,2	4,6	4,6	• <i>FBP de espuma</i> : Constituído de placas corrugadas de polietileno colocadas lado a lado, com placas de espumas fixadas sobre as placas corrugadas. Portanto, nesse meio suporte a maior porção da biomassa se desenvolve nos interstícios da espuma.
TAS (m ³ / m ² .d)	-	10-12	10-12	
COV (kgDBO/ m ³ .d)	0.71	0,38-0,80	0,38-0,80	
TDH (h)*	8.5-9,0	0,25	2,0	

*Os tempos de detenção nos FBPs foram determinados com o uso de traçadores radioativos, considerando as condições operacionais apresentadas nesse trabalho.

Fonte: (ALMEIDA *et al.*, 2012)

5.2 Definição dos períodos operacionais

Os resultados físico-químicos apresentados na tese referem-se ao monitoramento realizado por Almeida (2012). O monitoramento do sistema UASB-FBP foi dividido em três períodos. O período 1 (P1) iniciou-se após observação de um equilíbrio dinâmico aparente nas concentrações efluentes de N-NH₄⁺ do FBP de espuma, constatando-se o estabelecimento do processo de nitrificação. Isso ocorreu cerca de 100 dias após a partida deste FBP.

A partir desse momento, a divisão dos períodos foi conduzida conforme as cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas aos FBPs. As vazões afluentes para ambos os FBPs foram mantidas em torno de 4,6 m³/d durante todo o período de monitoramento (Tabela 5.1). Variações sazonais nas concentrações de matéria orgânica nos esgotos brutos comumente acontecem, sendo responsáveis pelas variações observadas nas COVs aplicadas.

Baseado nas cargas orgânicas do efluente do reator UASB, o período 2 (P2) foi iniciado quando as COV aplicadas começaram a aumentar (dia 201) e foi até o dia 303 (Figura 6.1). A partir desse dia, começou a ocorrer a diminuição sazonal das concentrações orgânicas dos esgotos brutos e efluentes do reator UASB. As concentrações de matéria orgânica tendem a ser menores no verão, em virtude do maior consumo de água pela população e pela incidência de chuvas, que ocasionam a diluição dos esgotos. Isto levou a uma redução significativa da

COV aplicada aos FBPs, o que caracterizou o início do período 3 (P3), que se estendeu até o dia 446.

5.3 Análise dos parâmetros físico-químicos

Parâmetros físico-químicos referentes à fase líquida (DQO, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, CaCO₃, pH, temperatura – Tabela 5.2) foram selecionados para apoiar as investigações sobre as populações de nitrificantes, anammox e desnitrificantes. Tais dados foram obtidos por Almeida (2012).

Tabela 5.2 – Parâmetros físico-químicos investigados, frequência de amostragem e metodologia para a realização das análises no monitoramento (campanhas de amostragem) do sistema UASB/FBP

Parâmetro	Frequência de amostragem	Metodologia	Referência
DQO total	2 a 3 vezes por semana	Titulometria	APHA (2012)
DQO filtrada	2 a 3 vezes por semana	Titulometria	APHA (2012)
STV	Por coleta	Método gravimétrico	APHA (2012)
N-NH ₄ ⁺	2 a 3 vezes por semana	Digestão/titulometria	APHA (2012)
N-NO ₂ ⁻	2 a 3 vezes por semana	Colorimetria	APHA (2012)
N- NO ₃ ⁻	2 a 3 vezes por semana	Colorimetria	Rodier (1975)
CaCO ₃ *	2 a 3 vezes por semana	Titulometria	APHA (2012)
Temperatura	2 a 3 vezes por semana	Potenciometria	APHA (2012))
pH	2 a 3 vezes por semana	Potenciometria	APHA (2012)
OD	2 a 3 vezes por semana	Fotoluminescência	APHA (2012)

* Em pH próximo à neutralidade, como é o caso de águas residuárias, a principal contribuição para a alcalinidade é dos bicarbonatos (HCO₃⁻). Entretanto, a metodologia utilizada no presente trabalho baseou-se na neutralização de íons capazes de reagir com ácidos, que incluem, além de HCO₃⁻, CO₃²⁻ e OH⁻. Portanto, os resultados de alcalinidade, discutido nos resultados, estão expressos em termos de mg/L de CaCO₃.

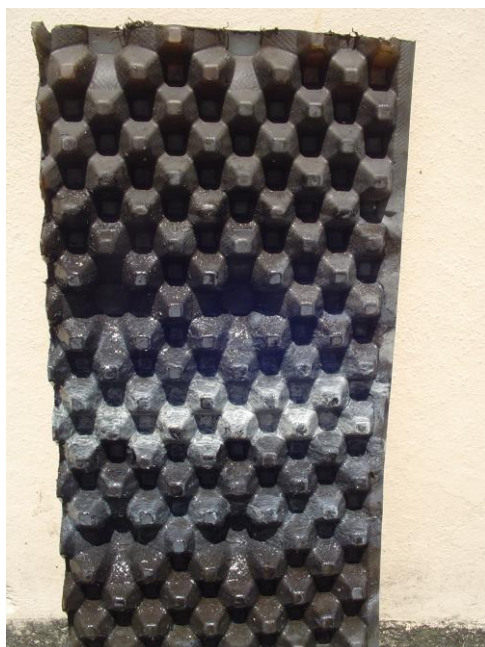
5.4 Coleta de biomassa e preparo das amostras

Para coleta de biomassa do FBP de placa, uma placa corrugada foi retirada de cada um dos quatro módulos do sistema (ver módulos na Figura 5.2). As placas foram raspadas com o auxílio de uma escova de plástico (escova de lavar roupas) e lavadas com tampão fosfato salino (PBS – NaCl 0,13 M; Na₂HPO₄ 7,0 mM; NaH₂PO₄; 3,0 mM; pH 7,2) para remoção do biofilme. O líquido recolhido de cada placa foi armazenado separadamente a 4°C para análises microbiológicas. No dia seguinte, o líquido foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos e o sedimento foi pesado e aliqotado para análises de sólidos totais voláteis (método adaptado de APHA, 2012) e para análises moleculares (preservação a – 20 °C).

Para o FBP de espuma, um pedaço de espuma foi extraído de cada módulo, conforme mostrado na Figura 5.3. Logo após, as espumas foram espremidas e lavadas várias vezes com tampão PBS. O líquido coletado de cada porção de espuma foi processado do mesmo modo como foi feito para o líquido coletado das placas do outro FBP. As quantidades de biomassa fresca removida de cada placa e de cada pedaço de espuma, bem como os resultados de análise de STV por compartimento, estão apresentados no Apêndice B.

Esta metodologia de análise de sólidos foi adaptada de APHA (2012), uma vez que não eram líquidas e não era possível controlar ou limitar o volume de solução-tampão utilizado para retirada da biomassa. A biomassa foi sedimentada por centrifugação para remoção do líquido e analisada quanto ao conteúdo de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV). Os ST representam as frações do lodo orgânica (que contém a biomassa) e inorgânica (não envolvida nas funções biológicas). Por sua vez, a parte orgânica contém micro-organismos ativos, micro-organismos inativos e uma fração orgânica não biodegradável. Essa biomassa inativa provavelmente é maior no FBP de espuma, devido ao fato de este meio-suporte conseguir reter maior quantidade de sólidos do que o de placas. Como a parte orgânica do lodo não foi analisada em termos de atividade, isso não foi levado em consideração.

Figura 5.2 – Imagens das placas corrugadas de polietileno amostradas do FBP de placa para coleta de biomassa



(A) Aspecto da placa com biomassa.



(B) Infestação de caramujos vista durante o P2 principalmente no compartimento inferior (4,20 m) do FBP



(C) Aspecto da placa após a remoção da biomassa

Figura 5.3 – Imagens dos pedaços de espuma de poliuretano amostrados do FBP de espuma para coleta de biomassa



(A) Amostragem dos pedaços de espuma



(B) Detalhe da presença de larvas, encontradas principalmente nos compartimentos superiores (1,05 e 2,10 m) do FBP



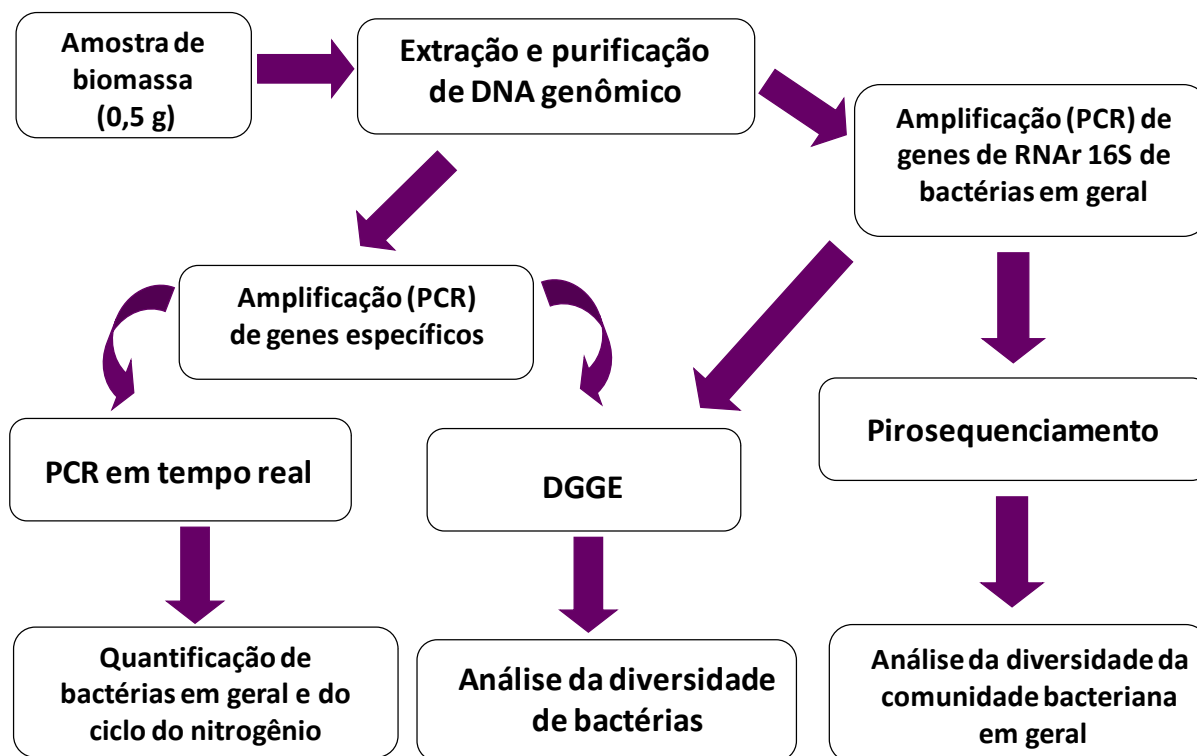
(C) Aspecto das espumas antes e após a remoção da biomassa

5.5 Análises moleculares

A investigação microbiológica foi efetuada três vezes dentro de um período de 300 dias. As coletas das amostras foram feitas em três fases operacionais distintas com faixas de cargas orgânicas aplicadas de 0,50 a 0,73 kg de DQO/ m³. d no P1, 0,60 a 0,80 kg de DQO/ m³. d no P2 e 0,40 a 0,50 kg de DQO/ m³.d no P3. As concentrações de carga orgânica aplicada da terceira fase operacional foram significativamente menores que as das fases anteriores (teste de Kruskall Wallis, $\alpha = 5\%$; ALMEIDA, 2012).

A comunidade microbiana foi investigada através das técnicas de PCR-DGGE (para determinar a estrutura da comunidade de AOB, e bactérias totais) e pirosequenciamento 454 para determinar a composição da comunidade bacteriana (Figura 5.4). A determinação da abundância de alguns grupos bacterianos (AOB, NOB – *Nitrospira* e *Nitrobacter*, anammox, e desnitrificantes), bem como de bactérias totais, foi realizada através de PCR em tempo real com genes específicos (descritos na Tabela 5.3). Detalhes metodológicos de cada técnica usada serão descritos nos itens a seguir.

Figura 5.4 – Etapas das análises moleculares da biomassa amostrada nos FBP



5.5.1 Extração e purificação de DNA

O DNA total foi extraído a partir 0,5 g de biomassa congelada, utilizando-se um método de físico-químico (adaptado de EGLI *et al.*, 2003). Após pesar a biomassa em microtubos (2mL), adicionou-se tampão TEN (0,1M de NaCl, 10mM de Tris-HCl e 1mM de EDTA pH 8,0) e micropérolas de vidro, levando-os ao microdesmembrador (tipo *bead-beater*) para rompimento das células microbianas. O sobrenadante foi separado dos debris celulares em outro microtubo para prosseguimento das etapas de extração de ácidos nucleicos com soluções contendo fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. Os ácidos nucleicos foram precipitados com isopropanol e acetato e preservados a -20°C . As amostras de DNA foram purificadas com o kit *Wizard DNA Clean-Up System* (Promega), conforme as instruções do fabricante e preservadas a -20°C . Cerca de 1,5 μL de cada extração foi aplicado em espectrofotômetro de ácidos nucleicos (*Nanodrop*, Thermocientific) para dosagem da concentração de DNA. Foram feitas duas extrações de DNA para cada amostra e os valores de concentração média estão apresentados no Apêndice A.

5.5.2 Amplificação de genes específicos por PCR

Os grupos de micro-organismos selecionados para investigação nas amostras de biomassa dos FBPs foram de bactérias em geral (Domínio *Bacteria*), bactérias oxidadoras de amônia (AOB), bactérias oxidadoras de nitrito (NOB) dos gêneros *Nitrobacter* e *Nitrospira*, bactérias desnitrificantes, e bactérias anammox. Seis biomarcadores diferentes foram utilizados na detecção, análise da diversidade e/ou quantificação de micro-organismos e estão apresentados na Tabela 5.3. Quatro biomarcadores são específicos para o gene RNAr 16S. O primeiro delimita uma região universalmente conservada entre os micro-organismos do Domínio *Bacteria* (posições 1055-1070 e 1392-1406, baseado no RNAr 16S de *Escherichia coli*).

Tabela 5.3 – Iniciadores específicos utilizados nas análises de biologia molecular

Gene-alvo	Grupo	Par de iniciadores	Sequência (5' para 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
RNAr 16S, região V8	bactérias em geral	1055F 1392R*	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGGCGGTGTGTAC	53	Ferris <i>et al.</i> (1996)
Enzima amônia monooxigenase (<i>amoA</i>)	AOB	<i>amoA</i> -1F* <i>amoA</i> -2R	GGGGTTTCTACTGGTGG CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	57	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
RNAr 16S	<i>Nitrobacter</i> sp.	Nitro-1198f Nitro-1423r	ACCCCTAGCAAATCTCAAAAA ACCG CTTCACCCCAGTCGCTGACC	58	Graham <i>et al.</i> (2007)
RNAr 16S	<i>Nitrospira</i> sp.	NTSPAf NTSPAr	CGCAACCCCTGCTTTTCAGT CGTTATCCTGGGCAGTCCTT	60	Kindaichi <i>et al.</i> (2006)
RNAr 16S	anammox	Pla46F- Amx667R	GGATTAGGCATGCAAGTC ACCAGAAGTTCCACTCTC	56	Neef <i>et al.</i> (1998) Van der Star <i>et al.</i> (2007)
Enzima óxido nitroso redutase	bactérias desnitrificantes	<i>nosZ</i> F <i>nosZ</i> 1622R	CGYTGTTCMTCGACAGCC AG CGSACCTTSTTGCCSTYGCG	55	Enwall <i>et al.</i> (2005)

* sequência da cauda GC: 5' CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG 3'

O terceiro, quarto e quinto marcadores delimitam, respectivamente, regiões de RNAr 16S de *Nitrospira* (região com 151pb, baseado nas posições 1113 a 1264 de *E. coli*; DIONISI *et al.*, 2002), de *Nitrobacter* (região com 397 pb; DEBRANGE & BARDIN *et al.*, 1995) e de bactérias do tipo anammox (região com 621 pb; VAN DER STAR *et al.*, 2007).

Para o estudo de AOB e desnitrificantes, optou-se por utilizar como biomarcadores os genes relacionados com a síntese de enzimas essenciais no metabolismo de cada grupo microbiano.

No caso de AOB, o gene-alvo é o *amoA*, que codifica a subunidade α da enzima amônia monooxigenase, uma enzima ligada à membrana celular que catalisa a primeira etapa de oxidação da amônia (ROTTHAWE *et al.*, 1997). Esse gene tem sido intensamente investigado por vários trabalhos na literatura e o número de sequências parciais e completas disponíveis na base de dados internacional tem aumentado significativamente (JUNIER *et al.*, 2010). No caso de desnitrificantes, como se trata de um grupo extremamente diverso de bactérias não relacionadas filogeneticamente, distribuídas em diferentes gêneros, o estudo com um único marcador de RNAr 16S seria inviável. Neste caso, o gene-alvo é o *nosZ* que codifica a síntese da enzima óxido nitroso redutase, responsável pela redução de N_2O a N_2 no processo de desnitrificação (ENWALL *et al.*, 2005). Esse gene foi utilizado como marcador funcional para analisar a abundância de bactérias desnitrificantes.

Para investigação da comunidade de AOB, foi utilizado o par de iniciadores *amoA* 1F e *amoA* 2R nas reações da PCR para amplificar um fragmento de DNA de aproximadamente 491 pares de bases (pb), correspondente ao gene que codifica a subunidade α da enzima amônia monooxigenase. Uma cauda GC (5' CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG 3') foi adicionada ao iniciador *amoA* 1F para evitar a desnaturação completa dos fragmentos amplificados. As reações foram feitas em volumes de 50 μ L contendo 10 μ L de tampão da PCR 5X (IV-B, Phorontria, já incluído $MgCl_2$), 0,4 μ L de dNTP (25 nM cada, Fermentas), 0,5 μ L de cada iniciador (30 pmol/ μ L, Fermentas), 0,25 μ L de enzima *Taq* DNA polimerase (5U/ μ L, Phorontria), 36,35 μ L de água bidestilada estéril e 2,0 μ L de amostra de DNA diluída (25 a 50 ng/ μ L). O programa da PCR consistiu de 4 minutos a 94 °C de desnaturação inicial, seguida por 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto (94 °C), anelamento dos iniciadores por 1 minuto (temperatura de acordo com par, conforme especificado na Tabela 6.2) e extensão por 1 minuto (72 °C). O programa era concluído com 10 minutos de extensão final a 72 °C.

5.5.3 Análise da estrutura da comunidade de bactérias oxidadoras de amônia nos FBPs por PCR-DGGE

A análise da diversidade de micro-organismos foi feita para o grupo de bactérias totais e de bactérias oxidadoras de amônia (AOB) através da técnica de PCR- DGGE (MUYZER, 1999). Nas reações da PCR para DGGE, um dos iniciadores continha uma cauda de GC (5' CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG 3') na extremidade 5' para evitar a desnaturação completa dos *amplicons* durante a migração no gel com gradiente desnaturante.

Os produtos resultantes da amplificação nas reações em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores para bactérias totais (1055F-1392RGC) e com iniciadores para AOB (amoA 1F-GC e amoA 2R) foram adicionados em géis de poliacrilamida contendo agentes desnaturantes (uréia e formamida) para separação dos diferentes fragmentos de DNA de AOB.

Os géis de DGGE de AOB continham 6% (p/v) de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida (37,5:1), e gradiente desnaturante de 45 a 60% (solução 100% desnaturante contém 7 M de uréia e 40% de formamida). Os géis de bactérias totais tinham 8% de poliacrilamida e gradiente desnaturante de 50 a 80%. A corrida da eletroforese foi realizada a 60°C, com 75V, durante 16,5 horas. Os géis foram corados com solução SYBR Gold (30 µL de corante 10.000X em 300 mL de tampão TAE 0,5X) e visualizados sob luz ultravioleta. As bandas observadas foram excisadas, adicionadas em 100 µL de água ultra-pura e preservadas a -20°C. Produtos da PCR com os iniciadores para o gene *amoA* foram feitos com o extrato das bandas e purificados conforme protocolo descrito no Apêndice F. O sequenciamento foi feito por eletroforese capilar em ABI3130, usando BigDye v3.1, em polímero POP7, pela empresa Valid Biotechnology (localizada na Escola de Veterinária da UFMG). As sequências foram comparadas com aquelas presentes no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) do NCBI (*National Center of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)). A árvore filogenética com sequências de *amoA* de AOB foi elaborada utilizando o programa MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007).

Os primeiros géis realizados foram com produtos da PCR (gene *amoA*) das amostras do FBP de espuma (Figuras 6.20B e C). Nessa época ainda não se tinha padronizado um método para quantificação de produtos da PCR. Posteriormente, a imagem do gel de agarose dos produtos da PCR desse gel de DGGE foi analisada no programa *ImageJ*. Os resultados indicaram que os 45 µL de produto da PCR aplicados em cada canaleta continham entre 400 e 600 ng de DNA, exceto os dos pontos 1,05 e 4,20 m (P3), cujas concentrações eram em torno de 300 a 350 ng. Nos outros géis de DGGE, a quantidade de DNA de cada produto da PCR foi estimada e padronizada, conforme explicado no Apêndice D.

5.5.4 Quantificação de AOB, NOB, anammox e desnitrificantes por PCR em tempo real

5.5.4.1 Obtenção dos plasmídios recombinantes para as curvas-padrão de DNA

O DNA utilizado nas curvas-padrão dos ensaios da PCR em tempo real eram plasmídios recombinantes contendo gene específico, obtidos por meio de clonagem do produto da PCR em vetor plasmidial (kit *pGem Easy Vector*, Promega) segundo as instruções do fabricante.

Para obtenção de plasmídios para quantificação de genes de RNAr 16S de bactérias em geral e de genes *nosZ* de desnitrificantes, utilizou-se DNA de cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (cedida gentilmente pelo laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do ICB/ UFMG) e para quantificação de cópias do gene de RNAr 16S de *Nitrobacter* sp., utilizou-se DNA de cultura pura de *Nitrobacter winogradskyi* (DSM 10237). Para quantificação de cópias de genes de RNAr 16S de *Nitrospira* e anammox, utilizou-se DNA genômico obtido das amostras extraídas do FBP de espuma. Finalmente, para quantificação de cópias do gene *amoA* de bactérias oxidadoras de amônia, utilizou-se DNA genômico obtido de amostras de reatores de enriquecimento de anammox (CAMPOS, 2011). O fragmento de gene *amoA*, contido no plasmídio recombinante, apresentou 100% de similaridade com *Nitrosomonas europaea*, como mostrado na árvore filogenética (sequência AOB 8, Figura 6.21).

As colônias brancas (que continham o plasmídio recombinante) foram repicadas em placa com ágar Luria Bertani ou LB (2,5 g de triptona, 1,25 g de extrato de levedura, 2,5 g de NaCl, ágar LB e 250 mL de água destilada) estéril com o auxílio de palitos de dente estéreis. Após o repique, os palitos foram introduzidos em reações de PCR com iniciadores específicos para confirmação da presença na colônia repicada do inserto de DNA de interesse. Em caso de resultado positivo, as colônias repicadas e crescidas na placa com ágar LB foram raspadas e preservadas em 1 mL de caldo LB estéril (suplementado com 10% de glicerol) a – 80°C.

Para extração do DNA plasmidial, os clone recombinantes foram repicados em 3 mL de caldo LB estéril, crescidos durante 16 a 24 horas a 35°C e submetidos à extração do plasmídio com o kit *Illustra Plasmid Prep Mini Spin* (GE Healthcare Life Sciences) conforme as instruções do fabricante. O DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro *Nanodrop* (Thermocientific). Após a quantificação do DNA plasmidial, alíquotas foram preparadas e congeladas a – 20°C para elaboração das curvas-padrão nos ensaios de PCR em tempo real.

5.5.4.2 Preparo das diluições-padrão de DNA

Diluições seriadas do DNA plasmidial foram feitas em água ultra-pura na proporção de 1:5. Para tanto, pipetou-se 2,0 µL do DNA plasmidial em 8,0 µL de água ultra-pura. Uma nova ponteira foi utilizada para homogeneizar a mistura para evitar contaminação com a diluição anterior. Pipetou-se uma alíquota de 2,0 µL no próximo microtubo, trocando-se novamente a ponteira e assim por diante. O número de cópias de plasmídios presentes nas diluições-padrão foi determinado considerando-se a equação 5.1 (WHELAN *et al.*, 2003):

$$\text{Cópias de DNA} = \frac{6,02 \times 10^{23} \text{ (cópias/mol)} \times \text{quantidade de DNA (ng)}}{\text{tamanho do DNA (pb)} \times 6,6 \times 10^{11} \text{ (ng/mol/bp)}} \quad (5.1)$$

Na qual o peso de cada nucleotídeo é de cerca de 330 daltons (ou 330 g/ mol). O peso de cada par de bases é 660 g/ mol (WHELAN *et al.*, 2003). O tamanho do DNA foi definido como a soma do inserto (produto da PCR específico) mais vetor plasmidial (3015 pb). Alíquotas de 2,0 µL de cada diluição foram adicionadas nas reações da PCR em tempo real, cujas curvas de amplificação foram utilizadas para elaboração da equação linear do experimento, explicada no item 5.5.4.4.

5.5.4.3 Preparo das reações da PCR em tempo real

As reações foram feitas em triplicata para cada amostra, para os controles-negativos e para cada diluição da curva-padrão de DNA. O *mix* utilizado foi o *MaximaTM SYBR Green/ ROX q PCR Master Mix 2X* (Fermentas). Distribuiu-se 18,0 µL de *mix* em cada pocinho da microplaca (96 poços, Axigen, borda elevada). Alíquotas de 2,0 µL de DNA diluído (em torno de 5,0 ng/ µL) de cada amostra ou padrão foram adicionadas nos respectivos pocinhos. As reações foram homogeneizadas com ponteira, vedando-se a microplaca com selante óptico (próprio para reações da PCR em tempo real).

A microplaca foi colocada em equipamento *7500 Real Time System* (Applied Biosystems) e o programa da PCR compunha-se de 40 ciclos de desnaturação por 1 minuto (94 °C), anelamento dos iniciadores por 1 minuto (temperatura de acordo com par, conforme especificado na Tabela 5.3) e extensão por 1 minuto (72 °C). O programa se encerrava com a elaboração da curva de *melting* ou de dissociação, útil para checar a pureza dos produtos amplificados, aparecendo-se apenas um pico no gráfico. Esta etapa consistia de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C, 30 segundos a 95 °C e 15 segundos a 60 °C.

5.5.4.4 Determinação do número de cópias de genes dos grupos bacterianos

O número de cópias de genes de cada grupo bacteriano presente nas amostras desconhecidas foi determinado por interpolação com a equação da reta ($y = ax + b$) gerada pela curva-padrão de DNA (plasmídeos recombinantes). Os termos da equação fornecidos pelo equipamento após os ensaios são: (y) valor de C_T , que é o número do ciclo no qual o sinal de fluorescência cruza o *Threshold* (limiar de fluorescência traçado dentro da fase exponencial de todas as curvas de amplificação); (a) inclinação da reta; (b) interpolação com o eixo y. A Tabela 5.4 apresenta as equações das curvas-padrão, bem como as eficiências dos ensaios realizados.

Tabela 5.4 – Equações das curvas-padrão e eficiências dos ensaios da PCR em tempo real de quantificação absoluta

Grupo-alvo	Par de iniciadores	Inclinação (slope)	Eficiência (%)	Equação da reta
Bactérias em geral	1055F/ 1392R	-3,135	108,4	$y = -3,135x + 6,764$
Bactérias oxidadoras de amônia (AOB)	amoA 1F/ amoA 2R	-3,123	109,0	$y = -3,123x + 7,378$
<i>Nitrobacter</i> sp.	Nitro-1198f Nitro-1423r	-3,290	101,3	$y = -3,290x + 5,766$
<i>Nitrospira</i> sp.	NTSPAf NTSPAr	-3,321	100,0	$y = -3,321x + 5,194$
Bactérias anammox	Pla 46F/ 667R	-3,287	101,2	$y = -3,287x + 5,363$
Bactérias desnitrificantes	nosZ F/ nosZ 1622R	-3,421	96,0	$y = -3,421x + 8,577$

O valor de x encontrado em cada amostra é o logaritmo da massa inicial do DNA de interesse. O exponencial de x (na base 10) foi determinado e, finalmente, esse valor foi utilizado na equação 5.1 para determinação do número de cópias de genes de cada grupo bacteriano em cada amostra desconhecida.

5.5.5 Pirosequenciamento 454

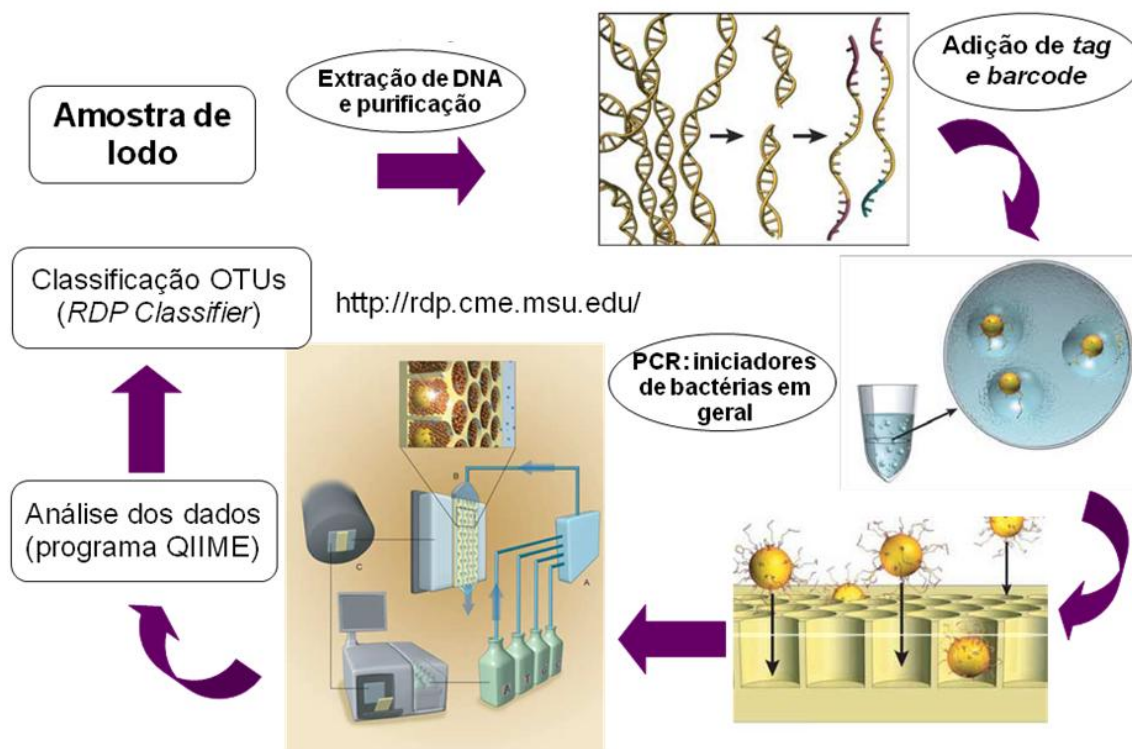
Na presente tese, foram selecionadas oito amostras diferentes de DNA para análise por pirosequenciamento, como mostrado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Amostras selecionadas para análise de pirosequenciamento 454

Origem da amostra	Compartimento (m)	Período	Objetivos
FBP de espuma	1,05	P1	Análise da comunidade bacteriana ao longo do FBP, particularmente diferenças entre topo e fundo.
	2,10		
	3,15		
	4,20		
FBP de placa	1,05	P1	Análise da comunidade bacteriana presente no topo e no fundo do FBP e comparação com a comunidade desenvolvida no FBP de espuma.
	4,20		
FBP de espuma	1,05	P3	Verificar alterações ocorridas na comunidade bacteriana ao longo do tempo, particularmente no momento em que houve redução significativa das cargas orgânicas.
	4,20		

Representação esquemática da análise de pirosequenciamento está apresentada na Figura 6.5. O DNA genômico extraído foi purificado com o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare)* de acordo com as especificações do fabricante. Após purificação, o DNA extraído foi desidratado em etanol 95% e enviado para o Instituto de Agrobiotecnologia de Rosário (INDEAR), na Argentina, para análise de pirosequenciamento (Figura 5.5) em equipamento 454 GS-FLX (*Life Sciences, Roche*).

Figura 5.5 – Representação esquemática da análise de pirosequenciamento 454



Fonte: adaptado de Margulies *et al.* (2005)

Os genes de RNAr 16S de bactérias em geral, contidos nas amostras de DNA, foram amplificados com os iniciadores para a região V4 do RNA ribossomal: 563F (5'-CACGACGTTGTAAAACGACAYTGGGYDTAAAGNG-3') e 802R (5' – CAGGAAACAGCTATGACC-3'). Uma sequência adaptadora (*tag*) foi incluída no iniciador 563F, para que as sequências se ligassem às micro-esferas. No iniciador 802R, foi incluído um *barcode* (sequência com 10 pares de bases, específica de cada amostra para posterior identificação e separação das sequências), sendo utilizados oito tipos de barcodes. As amostras foram agrupadas em quantias equimolares, em concentração de $9,92 \times 10^6$ moléculas de DNA/ μ L (tamanho dos *amplicons*: 336 pb). Em seguida, elas foram combinadas com 9,92 milhões de microesferas magnéticas (*beads*) e amplificadas por meio de PCR em emulsão (MARGULIES *et al.*, 2005). As microesferas, ligadas aos fragmentos de DNA, foram depositadas em distintos poços da placa de sequenciamento.

Os dados obtidos pelo pirosequenciamento foram analisados por meio do programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*; CAPORASO *et al.*, 2010a) para obtenção de dados estatísticos das amostras. O primeiro passo foi selecionar as sequências, adotando-se os seguintes parâmetros: comprimento maior ou igual a 200 pb e coeficiente de qualidade maior ou igual a 25. Dentre as sequências restantes, foram selecionadas somente as que possuíam o começo do *barcode* específico, com uma tolerância de até duas bases.

Uma vez identificado, o *barcode* foi removido da sequência. Dessas sequências selecionadas, identificou-se o começo do iniciador *forward* (neste caso composto por *tag* + iniciador *forward*), que foi removido tolerando nesse caso até três substituições na sequência. Nas sequências do passo anterior, procedeu-se a busca e remoção do iniciador *reverse* no final das sequências – caso não fosse encontrado, removeu-se apenas o *tag*. Finalmente, foram removidas as sequências que apresentaram homopolímeros de tamanho maior ou igual a seis e/ou, ao menos, uma base ambígua.

As unidades taxonômicas operacionais (*Operational Taxonomic Units* - OTUs) foram determinadas pelo o método *UCLUST* (EDGAR, 2010). Para a classificação taxonômica das OTUs representativas, utilizou-se o *RDP-Classifer* (*Ribossomal Database Project*; <http://rdp.cme.msu.edu/>), adotando-se limite de confiança de 0,5. Para limite de confiança maior ou igual a 0,5, observou-se similaridades maiores que 95% na região V4 do RNAr 16S de bactérias em geral depositadas na base de dados (CLAESSON *et al.*, 2009). As sequências

representativas de cada OTU foram alinhadas usando-se o *PyNast* (CAPORASO *et al.*, 2010b) e a árvore filogenética, o *FastTree* (PRICE *et al.*, 2009).

5.6 Análises estatísticas

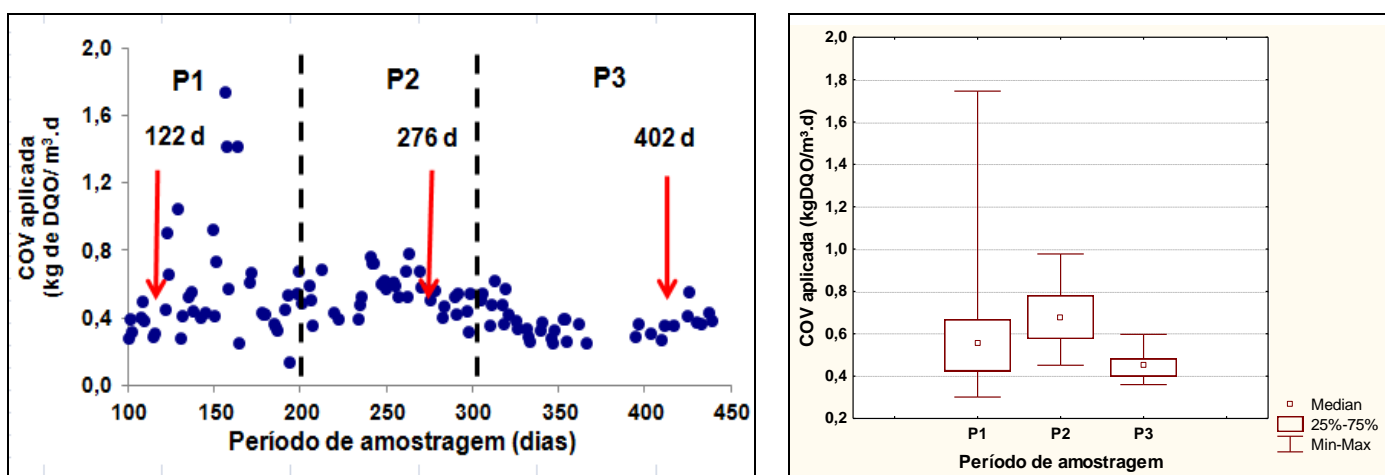
Os índices de diversidade α foram calculados no programa *PAST* (HAMMER *et al.*, 2012), enquanto que as análises de componentes principais (PCAs) foram realizadas no programa *STATISTICA 6.0*.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Aspectos físico-químicos e monitoramento do sistema UASB-FBP

Conforme descrito na metodologia (item 5.2), o monitoramento físico-químico do sistema UASB-FBP foi dividido em três períodos operacionais (P1, P2 e P3). Após a estabilização das concentrações efluentes de íon amônio e constatação do estabelecimento da nitrificação no FBP de espuma, iniciou-se o P1. A partir desse momento, o monitoramento foi dividido conforme as variações sazonais de cargas orgânicas. A Figura 6.1 apresenta a série temporal das cargas volumétricas orgânicas (COV) aplicadas aos FBPs, em termos de DQO_{total} , oriundas dos efluentes do reator UASB.

Figura 6.1 – Série temporal de COV aplicada nos FBPs e períodos de amostragem



(A) Série temporal com as setas vermelhas indicando as datas de amostragem da biomassa

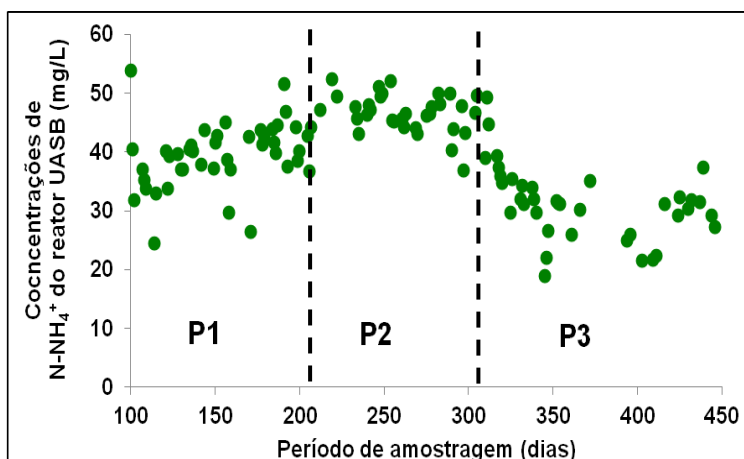
(B) Períodos de COV aplicada com diferença estatística nos 3 períodos (teste de Kruskal Wallis, $\alpha = 5\%$)

Observou-se que os três períodos apresentaram diferenças significativas quanto às COVs aplicadas (Figura 6.1B). O P1 (janeiro a abril/2010) foi marcado por grande variabilidade nas cargas orgânicas, provavelmente por ser um período de transição entre estação chuvosa e seca. Em P2 (abril a setembro/2010), as COVs aumentaram de 0,3-0,5 kg DQO/ m³. d (percentis 25 e 75%, respectivamente) para 0,5-0,6 kg DQO/ m³. Esse período abrangeu todo o inverno, estação na qual as COVs são maiores em virtude da menor quantidade de água nos esgotos. Em P3 (setembro/2010 a janeiro/2011), houve redução significativa das cargas orgânicas dos efluentes do reator UASB para 0,3-0,4 kg DQO/ m³. d, devido ao maior consumo de água pela população e à incidência de chuvas que ocorrem durante a primavera e verão.

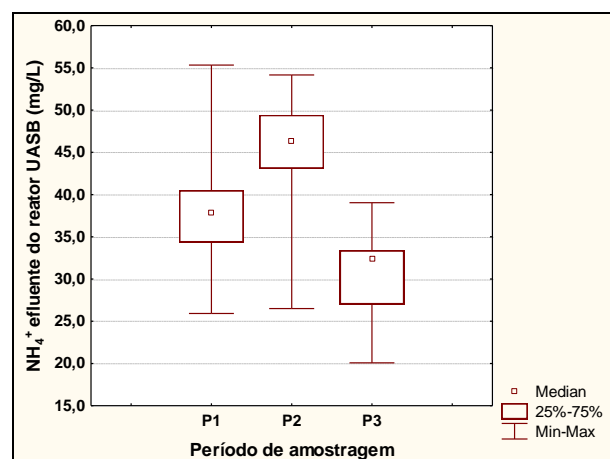
Foram 346 dias de monitoramento físico-químico do sistema UASB-FBP. As setas vermelhas (Figura 6.1) indicam o momento em que a biomassa foi amostrada em ambos os FBPs. A biomassa foi amostrada no início do monitoramento em P1, no final do P2 e no final do P3.

As concentrações afluentes de N-NH_4^+ (Figura 6.2) também foram diferentes ao longo dos períodos, mostrando a mesma tendência observada para as COV aplicadas, sendo proporcionais às quantidades de matéria orgânica (em termos de $\text{DQO}_{\text{total}}$) presentes nos efluentes do reator UASB. Isto é coerente, uma vez que os íons N-NH_4^+ são resultantes das atividades biológicas de hidrólise e desaminação da matéria orgânica ocorridas no reator UASB. As concentrações de N-NH_4^+ aumentaram do período 1 (percentis 25 e 75% entre 37-43 mg/L) para o 2 (44-48 mg/L) e reduziram significativamente no período 3 (percentis: 29-35 mg/L) (Tabela 6.1).

Figura 6.2 – Concentrações de N-amoniacal afluente aos FBPs (efluente do reator UASB)



(A) Série temporal das concentrações efluentes de N-NH_4^+ do reator UASB que alimentava os FBPs



(B) Concentrações de N-NH_4^+ em cada período, com diferença significativa nos 3 períodos (teste de Kruskal Wallis, $\alpha = 5\%$)

As faixas de COV aplicada, de concentrações efluentes de matéria orgânica, de compostos nitrogenados, de alcalinidade e de eficiências de remoção estão apresentadas na Tabela 6.1. No que diz respeito às eficiências de remoção de matéria orgânica carbonácea do sistema, foram considerados os valores de $\text{DQO}_{\text{solúvel}}$ dos efluentes, uma vez que esta constitui a parte dos sólidos orgânicos dissolvidos que são, em sua maioria, facilmente biodegradáveis. As eficiências de remoção de matéria orgânica no FBP de placas ficaram entre 25 e 64% (percentis 25 e 75%) em todo o período de monitoramento. O FBP de espuma, entretanto, sempre teve eficiências maiores: em P1, as eficiências de remoção de $\text{DQO}_{\text{solúvel}}$ variaram de

47 a 61%, com aumento significativo em P2 para 57 a 74%, mantendo-se entre 55 e 79% em P3 (teste de Kruskal Wallis, $\alpha = 5\%$).

Concentrações mínimas de nitrito foram detectadas nos efluentes dos FBPs (Tabela 6.1; Figuras 6.3 e 6.4), provavelmente porque este substrato estava sendo intensamente consumido biologicamente, por exemplo, por processos de nitrificação (oxidação de nitrito a nitrato), por desnitrificação (redução parcial ou completa de nitrito) ou por redução de nitrito a N_2 (processo Anammox). As menores concentrações de nitrito e maiores concentrações de nitrato nos efluentes do FBP de espuma (0,1-0,3 mg de $N-NO_2^-$ e 22-30 mg de $N-NO_3^-/L$) mostraram que as atividades microbiológicas de conversão e/ou remoção de compostos nitrogenados eram maiores do que no FBP de placas (1,0-2,4 de $N-NO_2^-$ e 9-17 mg de $N-NO_3^-/L$).

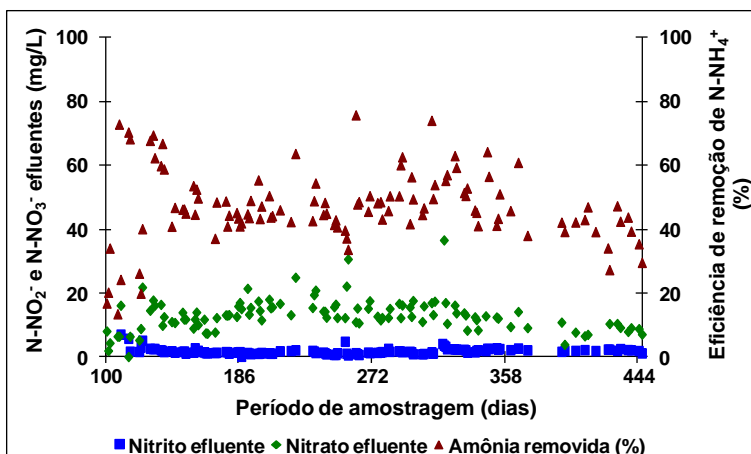
Tabela 6.1 – Faixas de COV aplicada aos FBPs e concentrações efluentes de matéria orgânica e de compostos nitrogenados do sistema UASB/ FBP

Efluente	Período	DQO _{sol} (mg/L)	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	CaCO ₃ (mg/L)	COV (kgDQO/ m ³ .d)
UASB	P1	54-88	37-43			247-267	
	P2	97-140	44-48			291-319	
	P3	58-85	29-35			219-248	
FBP de placa	P1	34-61	17-25	1,3-1,9	9-15	109-132	0,3-0,5
	P2	42-65	22-27	1,0-1,7	12-17	130-150	0,5-0,6
	P3	31-59	14-19	1,9-2,4	9-14	91-121	0,3-0,4
FBP de espuma	P1	26-43	6 - 9	0,1-0,3	24-30	4-16	0,3-0,6
	P2	28-55	6 - 11	0,2-0,3	22-30	13-42	0,5-0,6
	P3	15-31	1 - 3	0,1-0,2	21-25	4-12	0,3-0,4

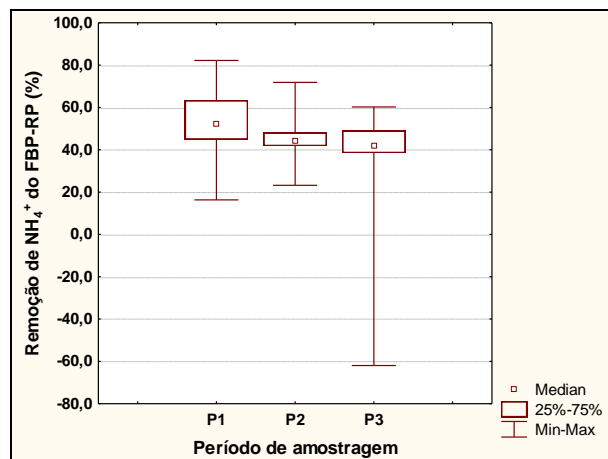
Faixas de valores : 50% dos dados estão entre os percentis 25 e 75%
(dados brutos de Almeida, 2012)

Com relação ao FBP de placa (Figura 6.3B), não houve diferença significativa entre os períodos em termos de eficiência de remoção de $N-NH_4^+$, com a maior parte dos dados variando entre 40 a 59%.

Figura 6.3 – Séries temporais das concentrações efluentes de nitrito e nitrato e eficiências de remoção de N-amoniaco no FBP de placa



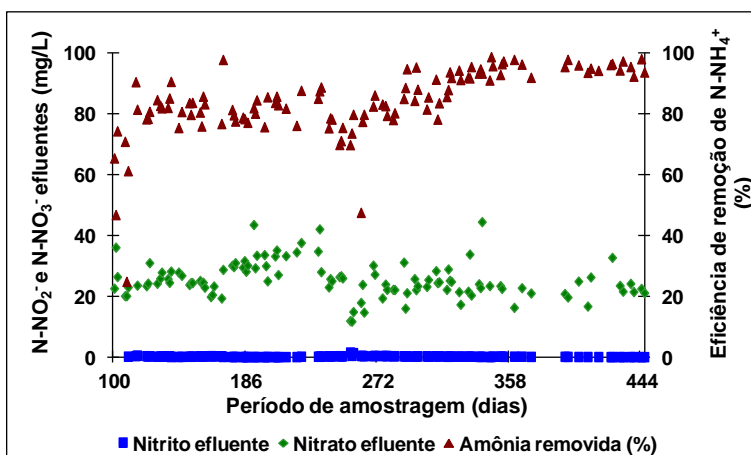
(A) Série temporal no FBP de placa



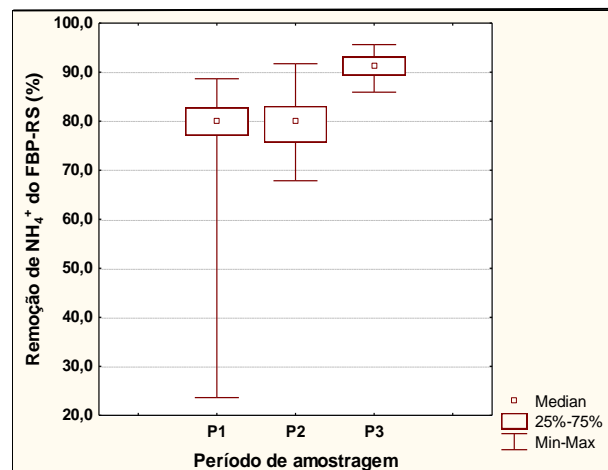
(B) Eficiências de remoção de N-amoniaco com diferença significativa em P1 (teste de Kruskal Wallis, $\alpha = 5\%$)

O FBP preenchido por espuma apresentou melhor desempenho na nitrificação (Figura 6.4) quando comparado ao FBP preenchido por placas, com concentrações maiores de N-NO_3^- e eficiências de remoção de N-NH_4^+ , no geral, acima de 80%. Inicialmente foi bem variável em P1 (74-81%), o que indica que o FBP ainda estava instável. Resultados estatísticos mostraram que em P2, a eficiência se manteve em torno de 74-82%, porém com redução na variabilidade dos dados, o que indica que o FBP teve aumento de estabilidade na remoção de N-NH_4^+ . Em P3, a eficiência de remoção de N-NH_4^+ aumentou significativamente para 89-93%.

Figura 6.4 – Séries temporais das concentrações efluentes de nitrito e nitrato e eficiências de remoção de N-amoniaco no FBP de espuma



(A) Série temporal no FBP de espuma



(B) Eficiências de remoção de N-amoniaco com diferença significativa em P3

Conforme mostrado na Tabela 6.2, as eficiências de remoção de matéria orgânica e de íon amônio no FBP de placas estiveram entre 25 a 64% de DQO_{solúvel} e 41 a 54% de N-NH₄⁺. O FBP de espuma, entretanto, sempre teve eficiências maiores: em P1 e P2, a remoção de DQO_{solúvel} variou de 48 a 74% e a de N-NH₄⁺, 77-86%; em P3, as remoções aumentaram, respectivamente, para 55-79% e 92-96%. O consumo de CaCO₃ também foi maior no FBP de espuma, apresentando remoção entre 86 a 99%, bem maior que no FBP de placa (47-60%) em todo o período de monitoramento.

Tabela 6.2 – Eficiências de remoção de matéria orgânica e amônia e consumo de alcalinidade nos FBPs pós-reator UASB

Efluente	Período	Remoção de DQO _{sol} (%)	Remoção de N-NH ₄ ⁺ (%)	Consumo de CaCO ₃ (%)
FBP de placa	P1	25-49	41-54	48-59
	P2	46-64	43-50	52-59
	P3	30-52	41-53	47-60
FBP de espuma	P1	48-63	77-83	94-98
	P2	57-74	78-86	86-96
	P3	55-79	92-96	95-99

Faixas de valores : 50% dos dados estão entre os percentis 25 e 75% (dados brutos de Almeida, 2012)

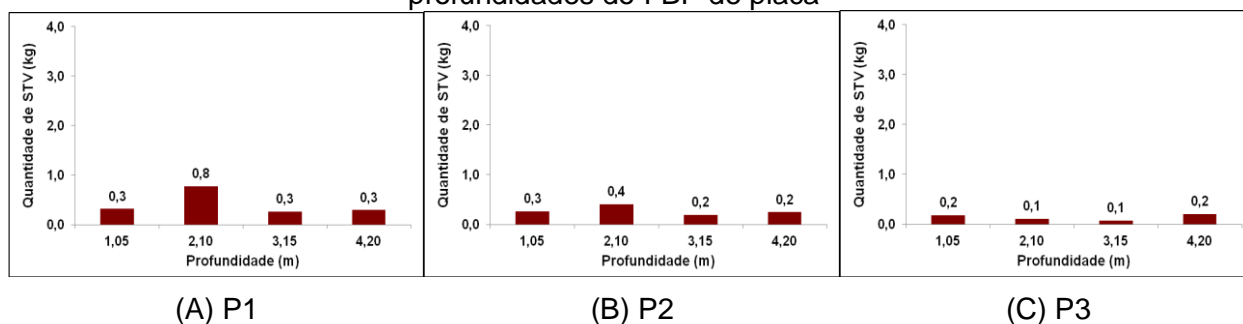
6.2 Caracterização da biomassa em termos de sólidos totais voláteis e DNA e distribuição de substratos ao longo dos FBPs

6.2.1 Estimativas de STV e da relação A/M em cada FBP

As estimativas de STV ao longo dos compartimentos (Figuras 6.5 e 6.6) mostraram, como esperado, que o FBP preenchido por espuma acumulou mais biomassa, em termos de concentração de STV, do que o FBP preenchido por placas, com valores variando de 1,7 a 7,2 e 0,1 a 0,4 kg, respectivamente. Os resultados mostraram que o meio-suporte de espuma teve capacidade de reter quantidades de biomassa dez vezes maiores que o meio-suporte de placas. Isso porque no FBP de placa, a biomassa cresce superficialmente, aderida ao meio-suporte, enquanto que no FBP de espuma, a biomassa cresce nos interstícios do meio-suporte e, devido ao elevado número de vazios, ocorrem maior acúmulo e retenção de biomassa. A maior retenção de STV no FBP de espuma indica uma maior quantidade de micro-organismos retidos no meio-suporte, o que explicaria o maior consumo de substratos neste FBP.

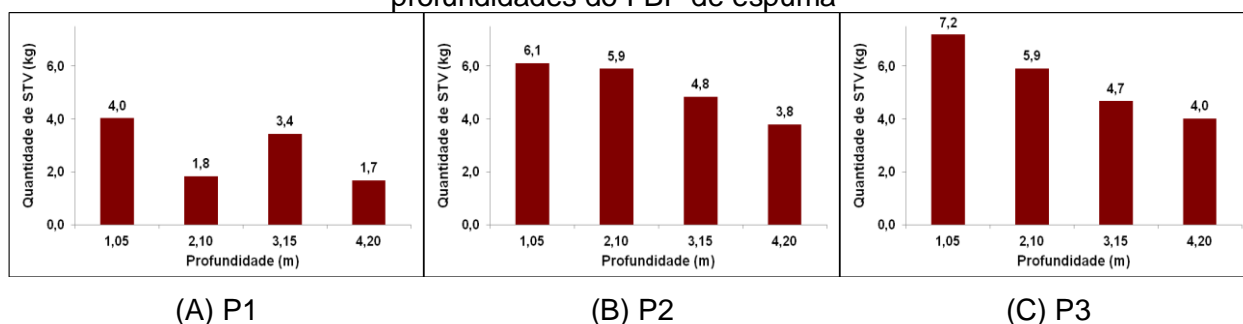
A menor retenção de biomassa no FBP de placa está relacionada a dois fatores: o primeiro é o despreendimento do biofilme, em virtude do cisalhamento provocado pelo líquido quando o biofilme está espesso; o segundo é a maior vulnerabilidade da biomassa em relação a predadores, que fica mais exposta por se fixar superficialmente no meio suporte.

Figura 6.5 – Estimativa da quantidade de sólidos totais voláteis (STV) ao longo das profundidades do FBP de placa



Os resultados de estimativa de biomassa do FBP de espuma foram semelhantes aos observados por Persson *et al.* (2002), que estudaram filtros biológicos percoladores preenchidos com meio suporte plástico (fluxo cruzado – *crossflow*) tratando efluente municipal. Neste trabalho, a biomassa foi amostrada nas profundidades de 0,5, 3 e 5 metros dos filtros e em 3 períodos do ano de 1999 (abril, agosto e dezembro), correspondendo a diferentes condições operacionais. A quantidade de biofilme (peso seco) variou ao longo do ano e geralmente mostrou uma diminuição com a profundidade dos FBPs.

Figura 6.6 - Estimativa da massa de sólidos totais voláteis (STV) ao longo das profundidades do FBP de espuma



No caso do FBP de placas, não se observaram diferenças marcantes nas quantidades de STV entre topo e fundo (Figura 6.5), provavelmente porque este FBP tratava um efluente já com reduzidas concentrações de matéria orgânica, enquanto que os FBPs de Persson *et al.* (2002), tratavam efluente bruto. No caso do FBP de espuma, por possuir um maior TRS, a retenção de substratos ocorreu logo no primeiro compartimento, promovendo intenso consumo bacteriano, o que ocasionou uma diferenciação nas concentrações orgânicas ao longo do filtro.

Conseqüentemente, desenvolvimento de micro-organismos heterotróficos e de STV foram maiores no topo do FBP. Entretanto, observou-se uma tendência de diminuição da quantidade de STV no FBP de placas em P3, quando houve a redução significativa da matéria orgânica afluyente.

Com o fim de se estabelecer uma relação entre o substrato disponível por unidade de biomassa em cada FBP, estimou-se a relação A/M, por meio da seguinte fórmula (VON SPERLING, 2012):

$$\frac{A}{M} = \frac{Q.S_0}{V.X_v}$$

Onde:

Q: vazão afluyente (m³/d)

S₀: concentração de DQO afluyente (ao invés de DBO₅) (kg/m³)

V: volume do reator (m³)

X_v: concentração de STV (ao invés de SSV) (kg/m³)

Valores de carga orgânica (em termos de kg de DQO_{sol}/ m³.d) foram utilizados em substituição aos termos Q, S₀ e V, uma vez que ela refere-se à quantidade de matéria orgânica aplicada diariamente ao FBP por unidade de volume de meio-suporte. As cargas orgânicas foram obtidas com base em valores médios de DQO solúvel (efluentes de reator UASB) dos últimos 7 dias anteriores à cada coleta de biomassa. A vazão média aduzida a cada FBP era de 4,6 m³/ d (Tabela 6.1). A massa de STV de cada FBP foi obtida pela soma das estimativas encontradas em cada profundidade, que foram apresentadas nas Figuras 6.5 e 6.6. Os resultados são apresentados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 – Valores estimados da relação A/M para cada FBP em P1, P2 e P3

Período	Carga aplicada (kgDQO _{sol} /d)	Massa de STV (kg)		Relação A/M	
		FBP de placa	FBP de espuma	FBP de placa	FBP de espuma
P1	0,24	1,66	10,98	0,15	0,02
P2	0,48	1,12	20,65	0,43	0,02
P3	0,31	0,56	21,82	0,55	0,01

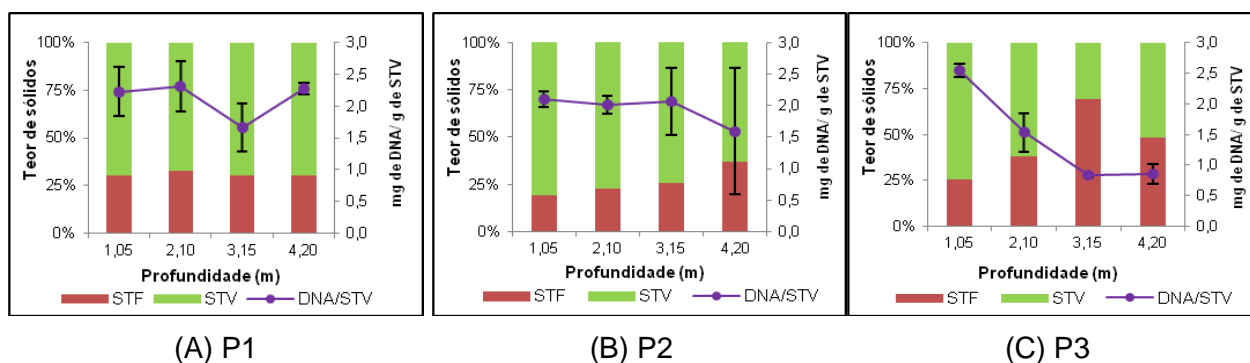
A relação A/M do FBP de placas aumentou ao longo do tempo, com valores muito superiores ao do FBP de espuma (da ordem de 6,6 a 38,7 vezes). Neste FBP, entretanto, a relação A/M reduziu longo do tempo (variando de 0,02 a 0,01 kg de DQO_{sol}/ kg de STV . d),

principalmente em P3, quando houve redução significativa da carga orgânica. Estes resultados mostram que a carga de matéria orgânica disponível por unidade de biomassa no meio-suporte de espuma foi muito menor que no de placa. Isto sugere que no FBP de espuma, as condições nutricionais seriam favoráveis para micro-organismos adaptados a escassez de nutrientes (oligotróficos), enquanto que no FBP de placas, para micro-organismos adaptados a maiores abundâncias de nutrientes, sem limitação de substratos.

6.2.2 Teores de STV, STF e de DNA por grama de biomassa

A razão STV/ST encontrada nas amostras de lodo do FBP de placas variou ao longo do tempo (Figura 6.7). Em P1, as porcentagens de STV eram em torno de 70% em todas as profundidades. Em P2, houve uma pequena estratificação do conteúdo de STV do lodo, variando de 81% no primeiro compartimento a 63% no último. Em P3, os valores de STV encontrados nas quatro profundidades (do topo para o fundo) foram: 74, 62, 31 e 51%.

Figura 6.7 – Teores de sólidos totais voláteis (STV) e sólidos totais fixos (STF) e concentrações de DNA por grama de STV nas amostras de lodo do FBP de placa



(A) P1

(B) P2

(C) P3

Concentrações de mg de DNA/g de STV: médias de duplicatas

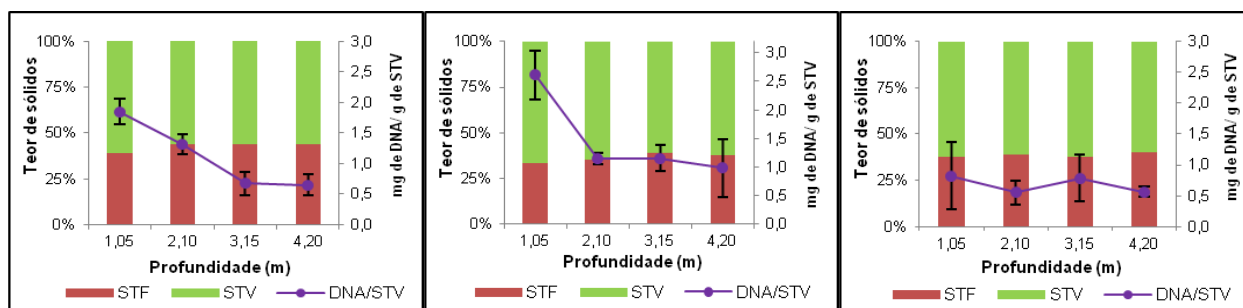
O aumento da parcela sólidos inorgânicos (STF) em P3, particularmente nos compartimentos inferiores do FBP, ocorreu por causa de uma infestação de caramujos ocorrida no final do P2 e durante P3. Durante a remoção de lodo em P3, alguns caramujos eventualmente foram removidos e suas conchas contribuíram para o aumento da fração inorgânica (STF) da biomassa. Estas observações são confirmadas quando se observa as concentrações médias de mg de DNA/ g de STV (Figura 6.7) em P3, as quais mostraram um decaimento ao longo da profundidade. A predação por metazoários (larvas de insetos e pequenos caramujos) é um fator responsável pela redução da nitrificação em FBPs (PARKER *et al.*, 1997; USEPA, 1993; TCHOBANOUGLOUS, 2007). Esses organismos intensificam o desprendimento da

biomassa e a fragmentação da matriz microbiana, provocando a diminuição da abundância de bactérias no reator.

Larvas de insetos e minhocas foram bastante encontradas nas espumas extraídas do compartimento superior do FBP de espuma (1,05 m), diminuindo ao longo do FBP e praticamente inexistentes no compartimento mais baixo (4,20 m). Portanto, efeitos de predação sobre a biomassa podem ter sido mais importantes nos compartimentos superiores do FBP de espuma. Por outro lado, estes efeitos foram bem menos intensos que no FBP de placas, pois, além do FBP de espuma conter uma quantidade maior de biomassa, esta se encontra mais protegida nos interstícios da espuma, enquanto que a do FBP de placas está mais exposta ao ataque de predadores por crescer superficialmente no meio-suporte.

Com relação às porcentagens de STV do FBP de espuma (Figura 6.8), estas estiveram em torno de 60%, valores menores que os do FBP de placa. No geral, as amostras do FBP de espuma também tiveram concentrações médias de DNA por grama de STV menores e muito variáveis ao longo dos compartimentos. Ou seja, isso indica que nem todo o STV do lodo é constituído por micro-organismos, podendo compreender matéria orgânica (biodegradável ou não) que fica retida e acumulada no meio-suporte de espuma. Valores de correlação entre as concentrações de STV e de DNA foram muito diferentes entre os filtros, com valores de R^2 de 0,88 para o FBP de placa e 0,18 para o FBP de espuma (Apêndice C; Figura 0.1).

Figura 6.8 – Teores de sólidos totais voláteis (STV) e sólidos totais fixos (STF) e concentrações de DNA por grama de STV nas amostras de lodo do FBP de espuma



(A) P1

(B) P2

(C) P3

Concentrações de mg de DNA/g de STV: médias de duplicatas

Como no FBP de placas, também foi observada uma tendência de diminuição da porcentagem de STV do topo para o fundo, particularmente em P1 (61 a 56%) e P2 (67 a 62%). Em termos de concentrações de DNA/STV, a estratificação do topo para o fundo foi mais brusca, com

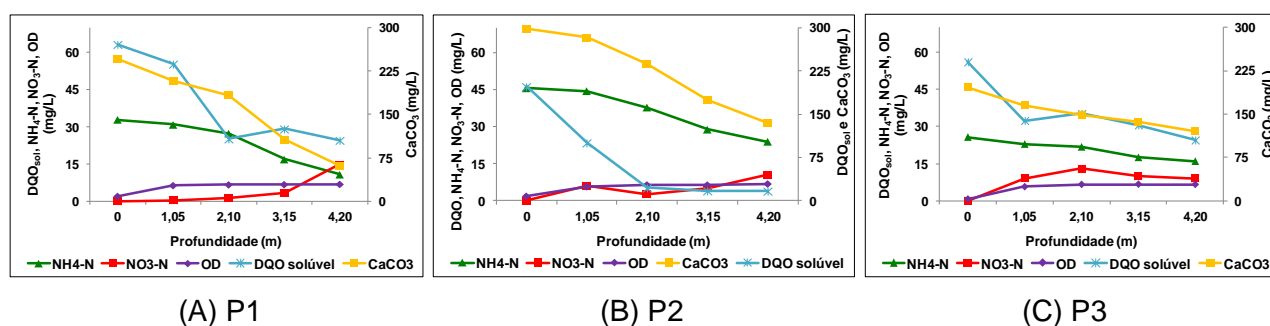
notáveis diferenças entre topo e fundo nos P1 e P2. Em P3, porém, estas concentrações médias não se diferiram muito ao longo dos compartimentos.

O decaimento de DNA ao longo dos compartimentos implica no decaimento de micro-organismos que, por sua vez, são influenciados pela disponibilidade de substratos na água residuária. A estratificação da biomassa é comumente observada em filtros biológicos percoladores e está relacionada principalmente às concentrações de matéria orgânica presentes em cada um dos seus compartimentos (WIK, 2003). Segundo o autor, as maiores concentrações se encontram nos compartimentos superiores, diminuindo ao longo das profundidades dos filtros em virtude do consumo da matéria orgânica pelos micro-organismos heterotróficos. À medida que a matéria orgânica vai sendo degradada, espera-se que a quantidade de bactérias diminua ao longo das profundidades dos FBP, permitindo um maior desenvolvimento de bactérias autotróficas, tais como as nitrificantes. Como as autotróficas têm uma taxa de crescimento específico mais lento, o rendimento de biomassa (em termos de STV e DNA) também deveria ser menor.

6.2.3 Perfis físico-químicos ao longo das profundidades dos FBPs

As Figuras 6.9 e 6.10 mostram um decaimento nas concentrações efluentes de substratos ao longo dos compartimentos dos FBPs, coerente com o decaimento de biomassa observado no item anterior.

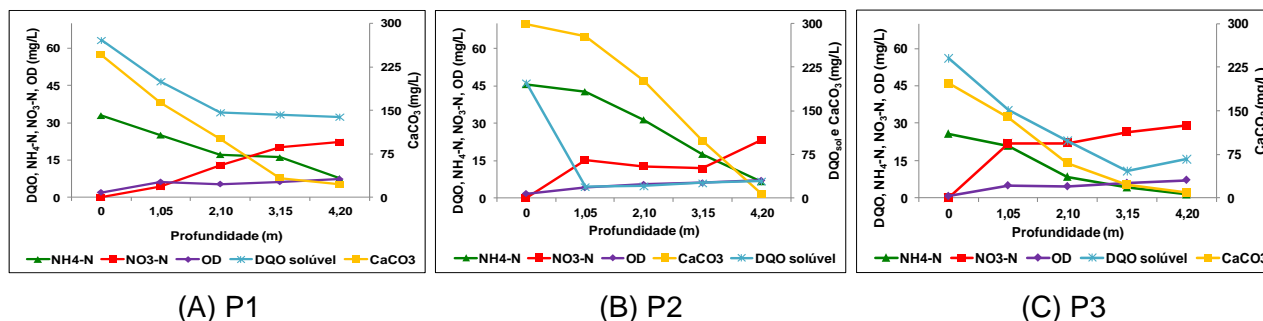
Figura 6.9 – Perfis de oxigênio dissolvido (OD), íon amônio (N-NH_4^+) e nitrato (N-NO_3^-) ao longo das profundidades do FBP de placa nos três períodos de monitoramento



Diferenças no decaimento de substratos entre os FBPs foram vistas também. No FBP de placas, devido à sua menor capacidade de retenção de sólidos e, conseqüentemente, de micro-organismos, no geral, ele apresentou decaimento menos acentuado nas concentrações de $\text{DQO}_{\text{solúvel}}$ (linhas azuis), N-amoniacal (linha verde) e de alcalinidade carbonato (linha

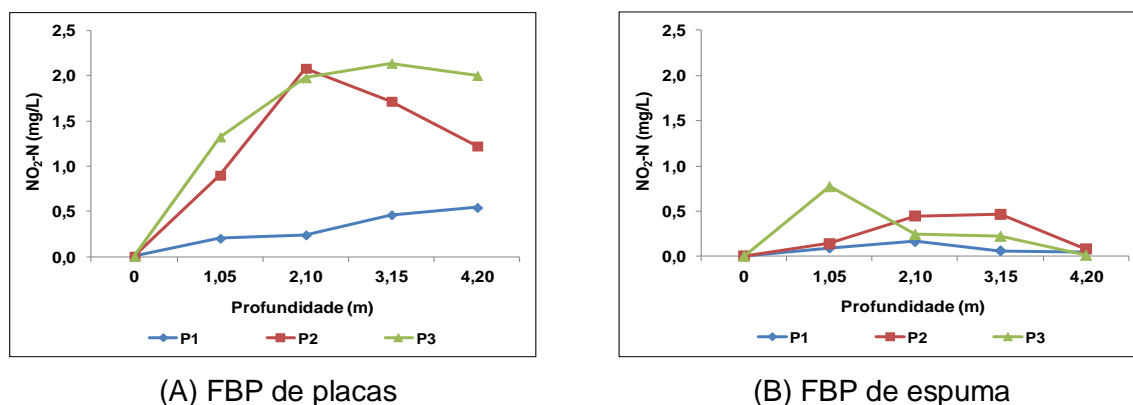
amarela) que o FPB de espuma ao longo das profundidades. A produção de nitrato (linha vermelha) foi bem menor também.

Figura 6.10 – Perfis de oxigênio dissolvido (OD), íon amônio ($\text{NH}_4\text{-N}$) e nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) ao longo das profundidades do FPB de espuma nos três períodos de monitoramento



Ainda com relação às Figuras 6.9 e 6.10, observa-se que as concentrações de alguns substratos diminuiram, enquanto que as de outros aumentaram. Há uma notória diversificação das condições físico-químicas entre topo e fundo dos FBPs. Basicamente, o topo caracterizou-se por poucas concentrações de oxigênio, ausências de formas oxidadas de nitrogênio (nitrito e nitrato), porém grandes quantidades de alcalinidade carbonato e íon amônio resultantes da degradação anaeróbia da matéria orgânica efetuada no reator UASB. No fundo dos FBPs, em virtude da atividade biológica e da aeração natural ao longo dos reatores, predominaram condições físico-químicas contrárias às observadas no topo: baixas concentrações de íon amônio e alcalinidade carbonato, maiores concentrações de nitrato e nitrito (este, no FPB de placa) e de oxigênio. No FPB de espuma, as concentrações de nitrito efluentes (Figura 6.11) continuaram baixas ao longo de toda a profundidade, sugerindo consumo intenso desse substrato em todos os compartimentos.

Figura 6.11 – Perfis de nitrito ($\text{NO}_2\text{-N}$) ao longo das profundidades dos FBPs nos três períodos de monitoramento



Dois fatores estão envolvidos no acúmulo de nitrato ao longo da profundidade dos FBPs. Um deles é a falta de matéria orgânica carbonácea para o desenvolvimento de desnitrificantes ao longo do FBP, uma vez que a maioria das espécies têm crescimento preferencialmente heterotrófico. Outro fator seria a disponibilidade de oxigênio dissolvido na água residuária, que faz com que os micro-organismos desnitrificantes prefiram realizar a respiração via oxigênio como aceptor final de elétrons, que é energeticamente mais favorável. Na maioria das espécies, a respiração via nitrato ocorre apenas sob condições anóxicas (MADIGAN *et al.*, 2010).

6.2.4 Análise de componentes principais com base nas características físico-químicas dos efluentes

Utilizando-se a análise de componentes principais (PCA), buscou-se investigar semelhanças ou diferenças entre os compartimentos dos FBPs a partir de um conjunto de dados obtidos de análises físico-químicas dos efluentes. Os parâmetros analisados eram relacionados ao desempenho da nitrificação em ambos os FBPs, sendo: concentrações de OD (mg/L), N-amoniaco ou íon amônio (mg/L de $N-NH_4^+$), nitrito (mg/L de $N-NO_2^-$), nitrato (mg/L de $N-NO_3^-$), alcalinidade carbonato (mg/L de $CaCO_3$), DBO_{total} (mg/L), DQO_{total} (mg/L), $DBO_{solúvel}$ (mg/L), SST (mg/L), SSV (mg/L), a razão $N-NH_4^+/OD$ (g/g), temperatura ($^{\circ}C$) e pH. Os resultados da PCA mostraram que os três primeiros componentes (CP_1 , CP_2 e CP_3) explicaram quase 81% da variação entre os compartimentos (Tabela 6.4).

Tabela 6.4 – Análise de componentes principais com base nas características dos efluentes: autovalores (*eigenvalues*) e porcentagens da variação explicadas por cada componente

Componentes principais (CPs)	Autovalores	Porcentagem absoluta (%)	Porcentagem acumulada (%)
CP_1	6,093	46,0	46,0
CP_2	3,146	24,5	70,4
CP_3	1,332	10,2	80,7

Os parâmetros mais influentes (circulados em verde) foram aqueles relacionados aos substratos: DQO_{total} , N-amoniaco, alcalinidade carbonato, com autovetores acima de 0,88 (Figura 6.12). Estes parâmetros têm uma associação altamente positiva entre si. Primeiro, porque o aumento nas concentrações de matéria orgânica nos efluentes provoca aumento nas concentrações de íon amônio por causa dos processos biológicos de amonificação da matéria orgânica.

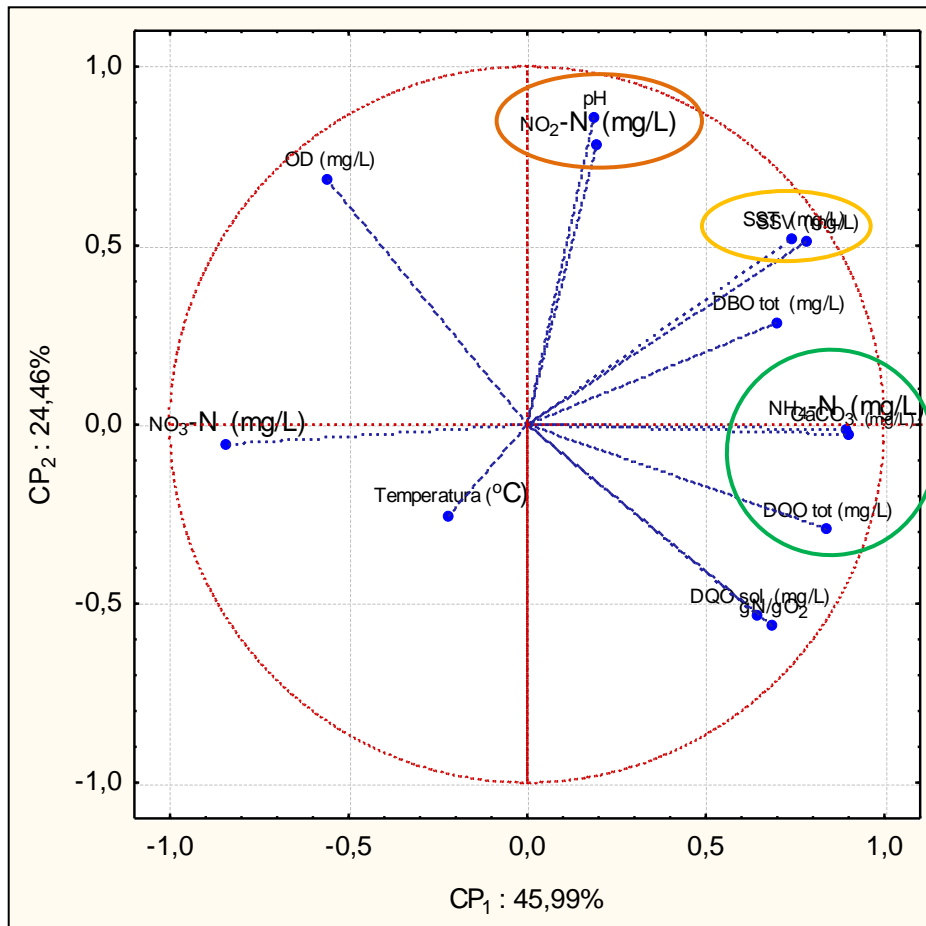
Segundo, o CO_2 liberado de processos fermentativos ou respiratórios aeróbios da matéria orgânica reage com a água, produzindo a alcalinidade. No sistema, a maior parte da alcalinidade veio da digestão anaeróbia ocorrida no reator UASB. Portanto, matéria orgânica, N-amoniacal e alcalinidade são parâmetros intimamente relacionados, significando que quando há a diminuição em um, ocorre concomitantemente diminuição nos outros, como observado nas Figuras 6.9 e 6.10.

A redução da alcalinidade ao longo dos compartimentos dos FBPs ocorreu por causa do consumo deste substrato como fonte de carbono inorgânico por micro-organismos autotróficos, incluindo as AOB e anammox. Portanto, os parâmetros $\text{NH}_4\text{-N}$ e CaCO_3 estiveram mais intimamente relacionados entre si, com valores de autovetores em torno de 0,90 no CP_1 (Figura 6.12). Por outro lado, estes dois parâmetros apresentaram uma relação antagônica com o parâmetro $\text{NO}_3\text{-N}$, cujo autovetor foi igual a $-0,85$ no CP_1 . Isto ocorreu porque o nitrato é um produto final do processo de oxidação do íon amônio. As concentrações de N-amoniacal decrescem ao longo das profundidades dos FBPs, em virtude do consumo por micro-organismos oxidadores de amônia, enquanto que as concentrações de nitrato aumentam, por causa da oxidação de nitrito por micro-organismos oxidadores de nitrito.

O parâmetro $\text{NO}_2\text{-N}$, entretanto, teve uma baixa correlação com íon amônio e nitrato (autovetor igual a 0,21 no CP_1), porém intimamente relacionado ao parâmetro pH (autovetor igual a 0,20; circulado em laranja). Baixos valores de pH implicam em excesso de H^+ , que reagem com o nitrito, formando HNO_2 , reduzindo, portanto, as concentrações de NO_2^- no meio.

Os parâmetros DBO total, SSV, SST, DQO solúvel e a razão g de $\text{N-NH}_4/\text{g}$ de O_2 também variaram positivamente conforme os anteriores. SSV e SST estiveram estritamente relacionados (circulados em amarelo), pois caracterizavam a porcentagem orgânica e inorgânica dos sólidos suspensos encontrados nos efluentes. Estes sólidos, geralmente, representam a biomassa excedente que se desprende do biofilme e vão para o efluente. A alta correlação entre os parâmetros indica que a proporção de sólidos fixos varia conforme a variação de sólidos orgânicos. Ou seja, se SST aumentam nos efluentes, há também aumento de SSV; e o contrário também.

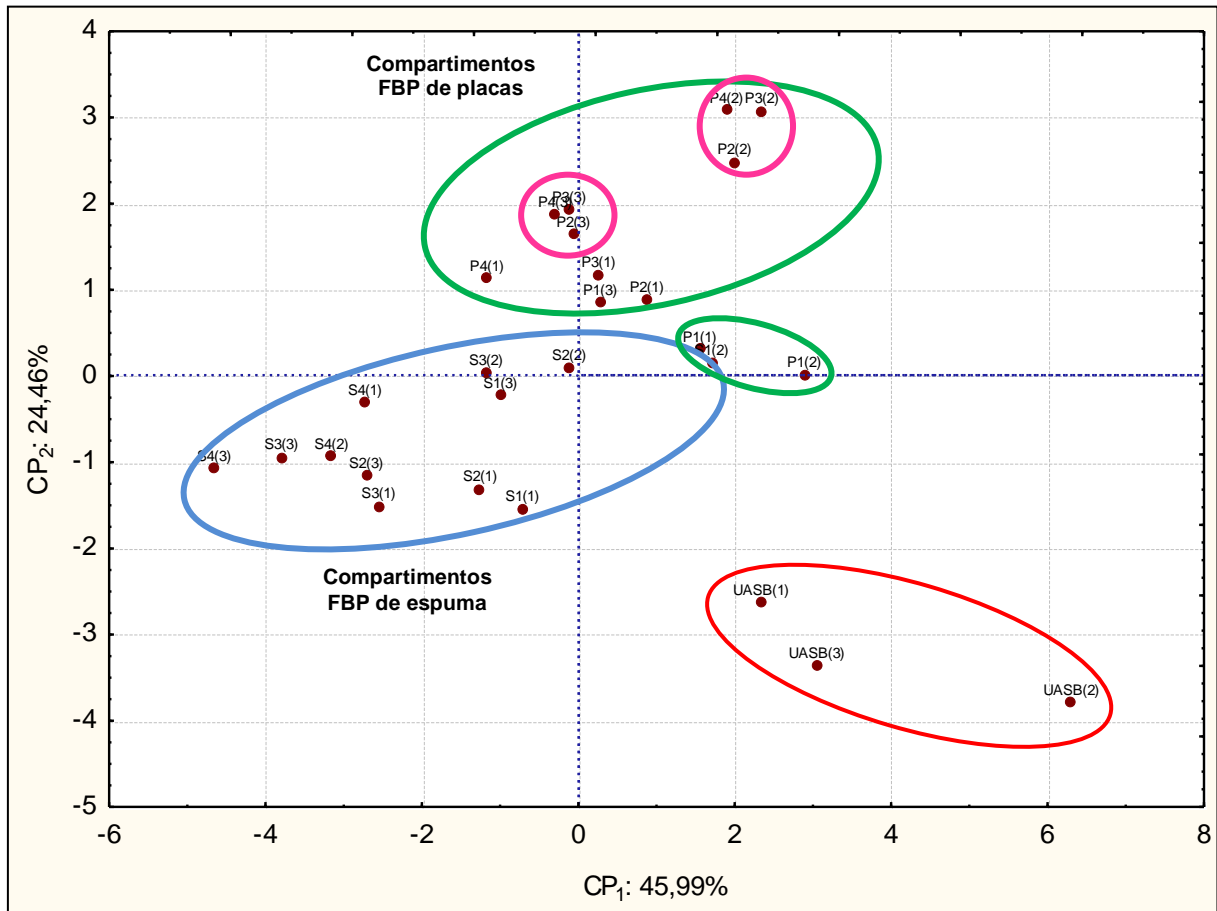
Figura 6.12 – Projeção das variáveis físico-químicas que caracterizavam os efluentes do sistema UASB-FBP. Os três primeiros componentes explicaram 81% das variações entre os compartimentos



A DQO solúvel esteve intimamente relacionada com a razão de g de NH₄-N/g de O₂ (autovetores 0,64 e 0,67 respectivamente) e ambos negativamente relacionados com OD (autovetor: -0,54). A DQO solúvel é a fração da matéria orgânica prontamente biodegradável. Como resultado da degradação desse substrato, houve simultaneamente a liberação de íons amônio. No FBP, a DQO solúvel diminuiu ao longo das profundidades em virtude do consumo microbiano por heterotróficos, e o íon amônio, por causa de micro-organismos autotróficos oxidadores de amônia, e por micro-organismos em geral como fonte de nitrogênio. As concentrações de oxigênio dissolvido aumentaram ao longo das profundidades dos FBPs, (Figuras 6.9 e 6.10), em virtude da aeração natural dos FBPs. O comportamento dos parâmetros DQO solúvel, g de NH₄-N/g de O₂ e OD, mostrou que quanto maiores as concentrações de DQO solúvel e da disponibilidade de íon amônio por grama de O₂, menores eram as concentrações de OD nos efluentes. Isso significa que quanto maior as concentrações de DQO solúvel e da razão g de NH₄-N/g de O₂, maior é a atividade microbiana por processos aeróbios e, portanto, maior o consumo de OD.

O gráfico de projeção das amostras (compartimentos) sobre os eixos CP_1 e CP_2 (Figura 6.13), mostra que houve uma separação espacial nítida entre o FBP de espuma e o de placas (compartimentos delimitados em azul e verde respectivamente). O reator UASB foi representado também em outra região do gráfico (circulado em vermelho). Isto mostra que os três reatores eram totalmente distintos em termos de efluentes.

Figura 6.13 – Análise de componentes principais com base nas características físico-químicas dos efluentes. Os três primeiros componentes explicaram 81% das variações entre os compartimentos



Legenda dos efluentes:		
S → FBP de espuma	P → FBP de placa	
S1(1): profundidade 1,05 m em P1	P3(1): profundidade 3,15 m em P1	
S1(2): profundidade 1,05 m em P2	P3(2): profundidade 3,15 m em P2	
S1(3): profundidade 1,05 m em P3	P3(3): profundidade 3,15 m em P3	
S2(1): profundidade 2,10 m em P1	P4(1): profundidade 4,20 m em P1	
S2(2): profundidade 2,10 m em P2	P4(2): profundidade 4,20 m em P2	
S2(3): profundidade 2,10 m em P3	P4(3): profundidade 4,20 m em P3	
S3(1): profundidade 3,15 m em P1	UASB(1): reator UASB em P1	
S3(2): profundidade 3,15 m em P2	UASB(2): reator UASB em P2	
S3(3): profundidade 3,15 m em P3	UASB(3): reator UASB em P3	

No FBP de placas ocorreu uma diferenciação clara do compartimento 1 para os demais (Figura 6.13). Em P2 e P3, entretanto, os três últimos compartimentos se assemelharam cada

vez mais (ver aumento da proximidade dos pontos P1, P2 e P3, circulados em rosa). Isto indica que as maiores diferenças físico-químicas neste FBP ocorreram entre o topo e o segundo compartimento. A partir do segundo compartimento, entretanto, as condições físico-químicas não devem ter sido muito alteradas.

6.2.5 Conclusões do item 6.2

Apesar de ambos os FBPs terem sido submetidos às mesmas condições operacionais, a configuração do meio-suporte influenciou sobremaneira no comportamento físico-químico de cada reator. O maior tempo de retenção de sólidos e de substratos proporcionado pelo meio-suporte de espuma permitiu que a biomassa microbiana desenvolvesse em quantidades 10 vezes maiores (em termos de STV) que no meio-suporte convencional, aumentando de 30 a 40% as eficiências de remoção de N-amoniaco e de matéria orgânica carbonácea do sistema UASB-FBP.

A maior retenção de biomassa seria um dos fatores que conferiram maior robustez do sistema frente a variações ambientais e à ação de predadores. Relações A/M mostraram que a disponibilidade de substratos nos dois FBPs era muito diferente, sendo que o FBP de placa apresentava valores muito maiores (6,6 a 38,7 vezes) que o FBP de espuma, indicando que as condições prevalentes neste último eram de escassez de substratos.

6.3 Quantificação da comunidade bacteriana envolvida no ciclo do nitrogênio por PCR em tempo real

6.3.1 Estimativa das concentrações de AOB, anammox, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, desnitrificantes e bactérias totais por grama de STV

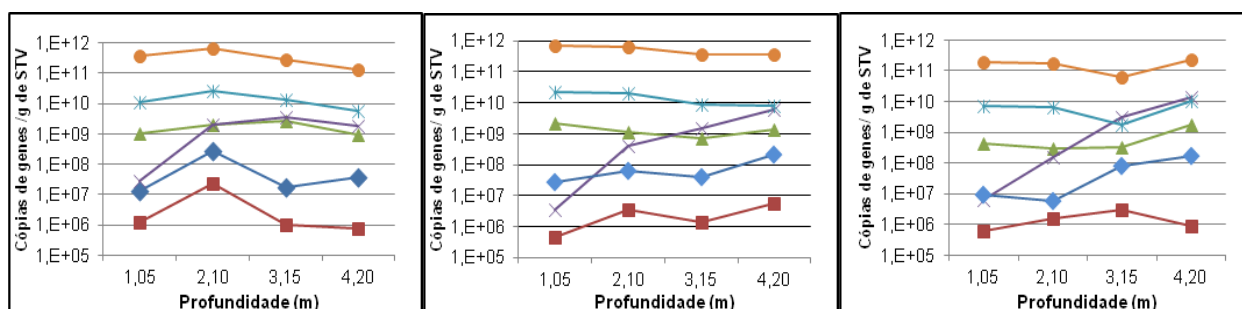
As Figuras 6.14 e 6.15 apresentam os resultados das quantificações por PCR em tempo real de genes de bactérias totais (RNAr 16S) e daquelas relacionadas com o ciclo do nitrogênio por grama de sólidos totais voláteis (STV). Cabe ressaltar que, no caso de desnitrificantes, foram quantificados cópias do gene *nosZ*, envolvido na redução do N_2O a N_2 . Portanto, somente as bactérias que realizam a desnitrificação completa foram quantificadas.

Alguns trabalhos na literatura têm detectado arqueias oxidadoras de amônia (AOA) em vários sistemas de tratamento (WEI *et al.*, 2011; YAPSAKLI *et al.*, 2011). Na presente tese, porém,

investigações realizadas por PCR convencional com o par de iniciadores Arch-*amoA* 1F/ Arch-*amoA* não detectaram AOA (dados não mostrados).

No FBP de placa, a quantidade total de genes de RNAr 16S de bactérias por grama de STV foi estimada em cerca de 10^{11} cópias (linha laranja, Figura 6.14). As abundâncias de genes específicos do ciclo do nitrogênio variaram ao longo dos compartimentos e ao longo do tempo. Dentro do ciclo do nitrogênio, os genes de desnitrificantes (linha azul) foram os mais abundantes, estando entre 10^9 - 10^{10} cópias por grama de STV. Tendência de decaimento destes genes foi observada ao longo do FBP em P1 e P2. Em P3, houve uma redução destes genes nos três primeiros compartimentos, provavelmente em virtude da redução das concentrações de matéria orgânica ocorrida neste período.

Figura 6.14 – Abundâncias de genes de bactérias totais, AOB, anammox, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, desnitrificantes por grama de STV no FBP de placa



Legenda:



Os genes de *Nitrobacter* (linha verde; 10^8 - 10^9 cópias por grama de STV) apresentaram dinâmicas populacionais semelhantes às de desnitrificantes. Os genes de *Nitrospira* (linha roxa) foram os que mais se alteraram ao longo das profundidades deste FBP, aumentando de 10^6 para 10^9 - 10^{10} cópias por grama de STV. Apesar do aumento de *Nitrospira* do topo para o fundo, as concentrações de NO_2^- não foram reduzidas no fundo do FBP de placa (Figura 7.11), pelo contrário, no geral, elas aumentaram. Fatores que podem ter influenciado no desenvolvimento de *Nitrospira* ao longo do FBP serão discutidos no item 6.3.2.

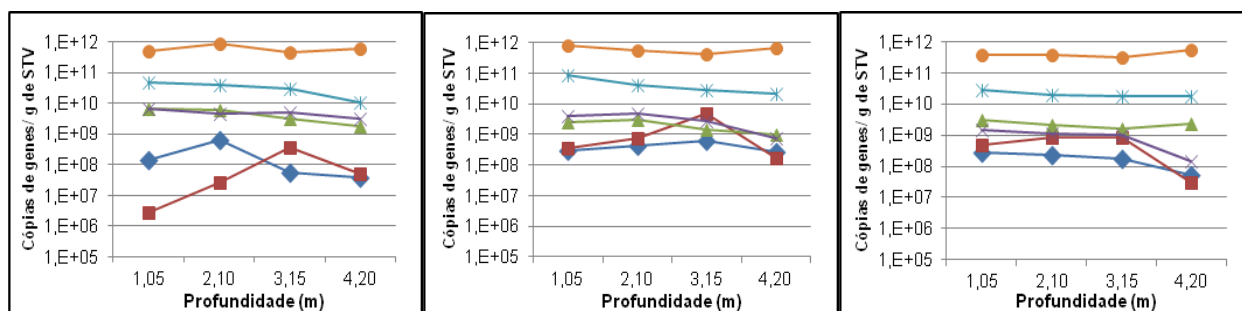
As quantidades de genes de NOB foram maiores que os de AOB em ambos os FBPs, o que já foi reportado na literatura em outros sistemas de tratamento em escala plena (DIONISI *et al.* 2002; HARMS *et al.* 2003; YAPSAKLI *et al.* 2011). Diante disso, conclui-se que ambos os sistemas não tinham limitações nas concentrações de OD, havendo oxigênio disponível para

manutenção de ambas as populações de oxidadoras de nitrito. Caso contrário, o desenvolvimento de NOB não seria possível, uma vez que são mais sensíveis às limitações de oxigênio e menos competitivas que as AOB. Outro ponto é a produção de NO_2^- para manutenção das populações de NOB. As populações de AOB, mesmo em quantidade menor, eram ativas o suficiente para manter as populações de NOB ou, então, outros grupos microbianos poderiam estar envolvidos na produção de NO_2^- , tais como desnitrificantes que realizam a desnitrificação incompleta (redução de nitrato a nitrito).

Com relação aos grupos oxidadores de amônia, as quantidades de genes de AOB foram maiores (linha azul; 10^7 - 10^8 cópias por grama de STV) que as de anammox (linha vermelha; 10^5 - 10^7 por grama de STV). Embora as quantidades sejam diferentes, as dinâmicas populacionais dos dois grupos foram semelhantes: em P1, tendência de aumento das populações da profundidade 1,05 para 2,10m e diminuição nas profundidades inferiores; nos outros períodos (P2 e P3) houve aumento de ambas as populações ao longo das profundidades do FBP (com exceção da profundidade 4,20m em P3 para anammox). Isso pode ser explicado pelo fato das AOB produzirem nitrito, que poderia ser usado pelas anammox (na oxidação anaeróbia da amônia). Trata-se de uma associação sintrófica (e sinérgica) destes dois grupos. Mesmo em sistemas anóxicos (tais como reatores Anammox), as AOB estão presentes e são importantes para consumir o OD residual, além da produção de nitrito (XIAO *et al.*, 2010).

No FBP de espuma, a quantidade total genes de RNAr 16S de bactérias por grama de STV foi em torno de 10^{11} cópias de genes também (linha laranja, Figura 6.15). Dentro do ciclo do nitrogênio, os genes mais abundantes foram também os de desnitrificantes (linha azul), em torno de 10^{10} cópias por grama de STV, com tendência de redução dos genes ao longo das profundidades. Ao contrário do que ocorreu no FBP de placa, as quantidades de genes de *Nitrobacter* (linha verde) e de *Nitrospira* (linha roxa) foram semelhantes (10^8 - 10^9 cópias), com tendência de decaimento ao longo do FBP. Os grupos que apresentaram maiores variações populacionais foram os de AOB (linha azul) e anammox (linha vermelha), com valores entre 10^6 - 10^9 cópias de genes por grama de STV. Observou-se uma distribuição diferenciada dos genes de AOB e anammox ao longo dos compartimentos do FBP e ao longo do tempo, indicando uma competição entre os grupos (provavelmente por íon amônio).

Figura 6.15 – Abundâncias de genes de AOB, anammox, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, desnitrificantes e bactérias totais por grama de STV no **FBP de espuma**



Legenda:



Em P1, AOB predominou nos compartimentos superiores, enquanto que anammox, no terceiro compartimento (3,15m). A partir de P2, as populações se igualaram nos dois primeiros compartimentos, mas as de anammox ainda predominavam no terceiro. Em P3, genes de anammox passaram a predominar em todos os três primeiros compartimentos. No último compartimento (4,20 m), as quantidades de genes eram semelhantes entre AOB e anammox, menores que as encontradas nos outros compartimentos. Essa diminuição das populações no último compartimento ocorreu em virtude da reduzida quantidade de $N-NH_4^+$ disponível e de nitrito (este último importante para o desenvolvimento de anammox), com concentrações praticamente iguais a zero (Figuras 6.11).

Ao longo do tempo, à medida que o meio-suporte foi sendo colonizado (aumento em termos de STV), mais nichos anóxicos foram surgindo, ocorrendo aumento das populações de anammox (por exemplo, 10^6 a 10^8 no topo do FBP do P1 para P2). Discussão mais aprofundada sobre a relação AOB e anammox será apresentada no item 6.7.1. A distribuição de AOB ao longo de ambos os FBPs foi semelhante à observada por Persson *et al.* (2002), que quantificou a população de AOB ao longo de FBPs, preenchidos com meio suporte *cross-flow*, tratando efluente municipal. Eles observaram que a população de AOB se distribuiu de forma diferente dependendo das condições ambientais estabelecidas dentro dos FBPs; em todo caso, houve uma quantidade muito baixa de AOB por peso seco de biomassa no fundo dos FBPs ($3,3 \pm 0,8$ g de SS/m² em abril; $4,5 \pm 0,9$ de SS/m² em agosto; $7,9 \pm 2,4$ de SS/m² em dezembro). Em condições favoráveis (altas temperaturas e alta carga de amônia), as quantidades de AOB estimadas foram mais altas no topo do FBP ($24,2 \pm 8,9$ de SS/m² em agosto), mas diminuiriam acentuadamente com a profundidade. Nestas condições, eram

encontradas maiores quantidades de AOB nas partes superiores, deixando apenas pequenas quantidades para sustentar populações de AOB nas partes inferiores. Inversamente, durante condições desfavoráveis (baixa carga de amônia e baixas temperaturas; $12,1 \pm 4,9$ de SS/m² em abril), havia menos AOB, porém uniformemente distribuídas ao longo do FBP.

Apesar do FBP de placa ter maiores porcentagens relativas de NOB, particularmente de *Nitrospira*, os efluentes deste filtro apresentaram maiores concentrações de nitrito em relação ao FBP de espuma (Figura 6.11). Isto esteve relacionado ao desenvolvimento limitado da biomassa neste tipo de meio-suporte, pois esta frequentemente estava mais exposta à predação e ao estresse hidráulico, o que provocava o desprendimento do biofilme. O FBP de espuma, embora tenha apresentado porcentagem relativamente menor de oxidadoras de nitrito, em termos de biomassa total, conseguiu reter maior quantidade destas bactérias, havendo maior consumo de nitrito. Além disso, outro grupo microbiano que contribuiu para o consumo desse substrato foram as bactérias anammox, cujo desenvolvimento foi mais bem-sucedido no FBP de espuma (evidenciado pelo maior número de cópias de genes de anammox por g de STV).

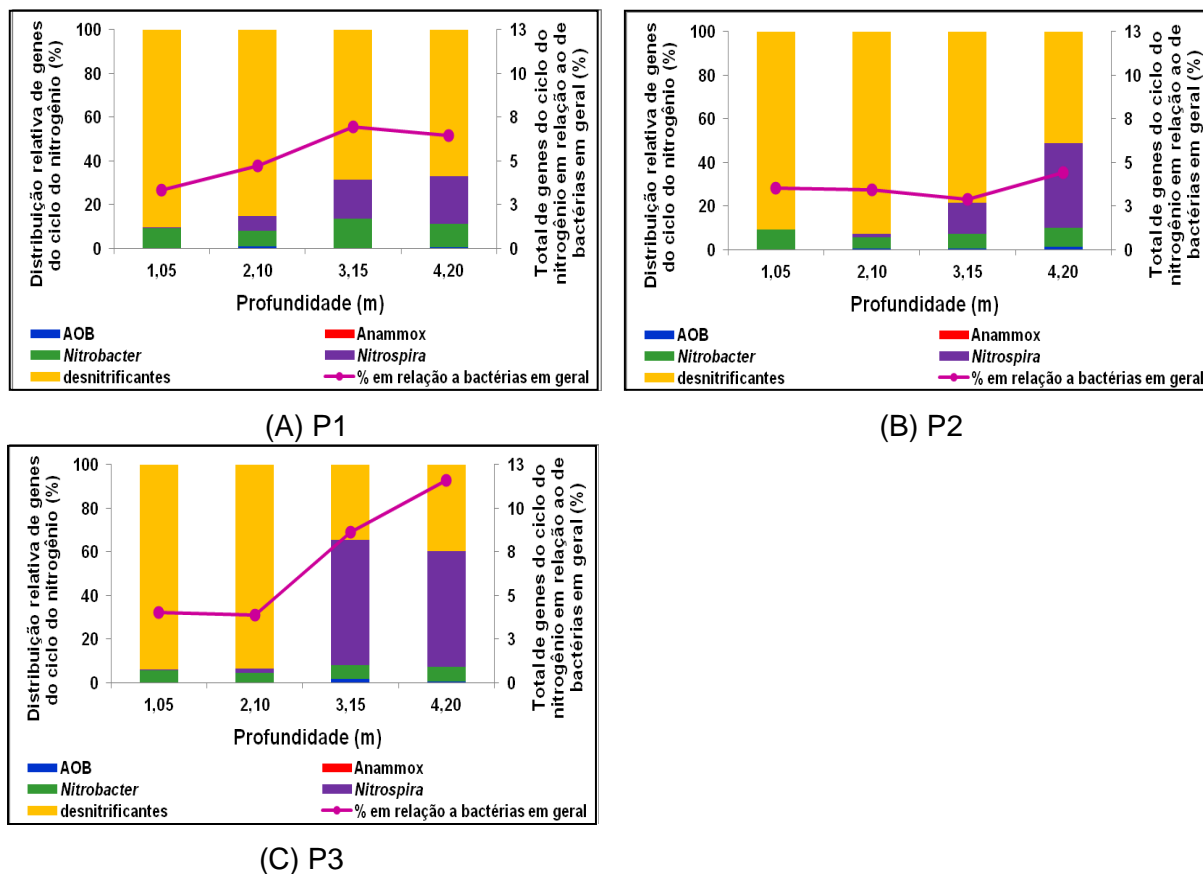
6.3.2 Distribuição relativa das bactérias do ciclo do nitrogênio e abundâncias em relação ao total de bactérias

No FBP de placas, observou-se aumento da abundância relativa de bactérias do ciclo do nitrogênio ao longo das profundidades (linha rosa, variando de 3 a 12%) principalmente em virtude do aumento de *Nitrospira* (barra roxa, Figura 6.16). Membros deste gênero predominaram sobre *Nitrobacter* na maioria dos compartimentos, o que corroborou com resultados comumente encontrados na literatura (SCHRAMM *et al.*, 1999; DAIMS *et al.*, 2001; DIONISI *et al.*, 2002). Populações de desnitrificantes diminuíram relativamente, mas continuaram em termos de cópias por grama de STV (entre 10^9 e 10^{10}).

Dois fatores que podem ter inibido o desenvolvimento de *Nitrospira* nos compartimentos superiores do FBP foram as concentrações de sulfeto e íon amônio presentes nos efluentes. Dados da literatura revelam que as concentrações de sulfeto presentes nos efluentes de reatores UASB tratando esgoto sanitário estão entre 7 e 11 mg/L (SOUZA, 2010). No presente trabalho, as concentrações de N-NH₄⁺ variaram entre 29 e 48 mg/L (Tabela 6.1). Tais concentrações de ambos os compostos são, portanto, consideradas tóxicas para o desenvolvimento de oxidadores de nitrito (Tabela 3.2). Além de NOB, as concentrações de

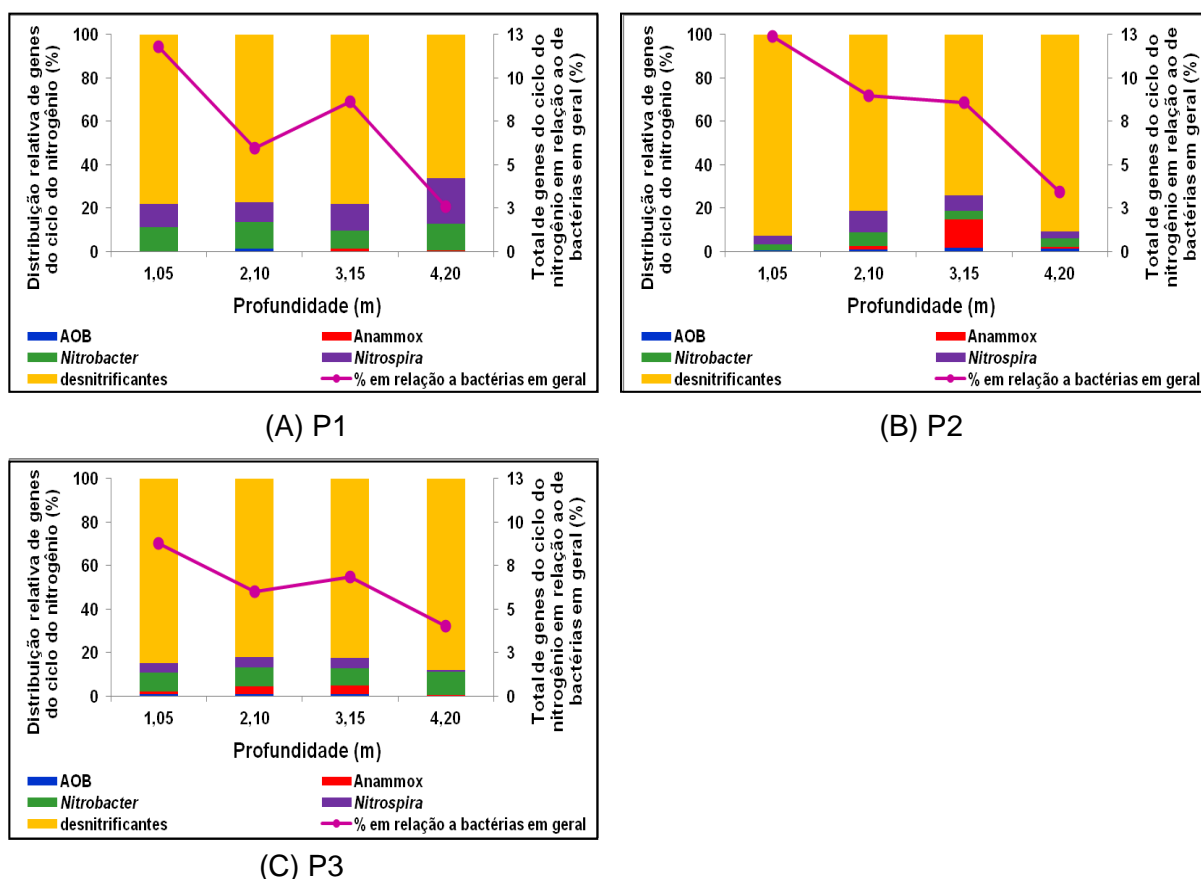
sulfeto podem ter também inibido o crescimento de AOB e anammox logo nos primeiros compartimentos.

Figura 6.16 – Distribuição relativa de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio e abundância em relação ao total de genes de bactérias nas amostras do **FBP de placa**



Já no FBP de espuma, observou-se diminuição das abundâncias relativas dos genes de bactérias do ciclo do nitrogênio ao longo das profundidades e ao longo do tempo (linha rosa, 12 a 3%; Figura 6.17). No geral, as abundâncias de NOB (*Nitrobacter* e *Nitrospira*, barras verde e roxa, respectivamente) foram maiores no início do monitoramento e diminuíram ao longo do tempo, provavelmente em decorrência do desenvolvimento de anammox (barra vermelha). O consumo de nitrito por bactérias anammox pode ter sido o fator responsável pelo menor desenvolvimento de NOB, particularmente *Nitrospira*, no FBP de espuma.

Figura 6.17 – Distribuição relativa de genes de bactérias do ciclo do nitrogênio e abundância em relação ao total de genes de bactérias nas amostras do **FBP de espuma**



6.3.3 Análise de componentes principais com base nas características físico-químicas e moleculares do lodo

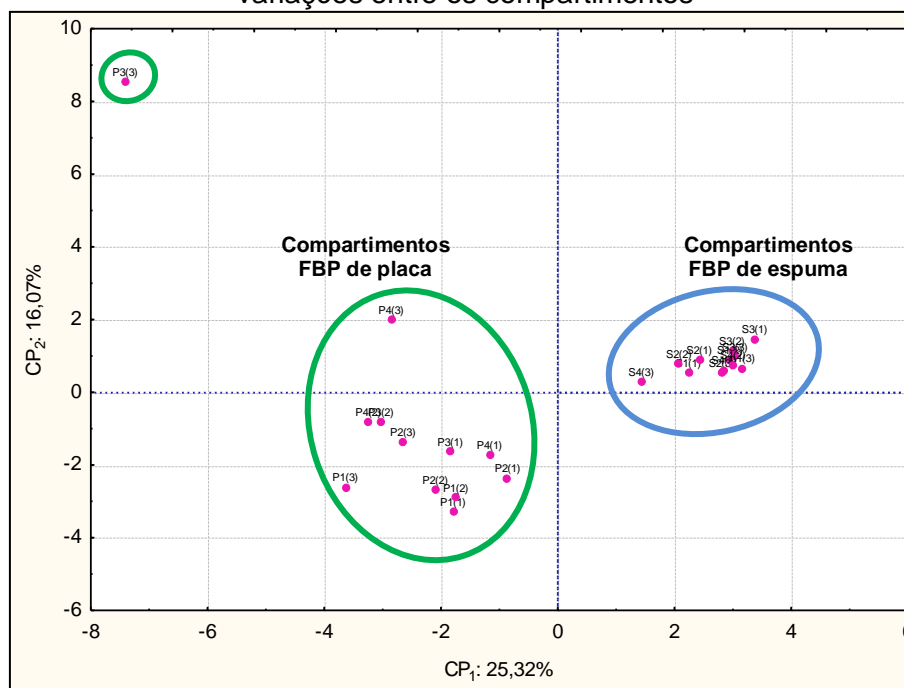
Foi realizada uma segunda análise de PCA, baseado nas características dos lodos amostrados, com o fim de identificar semelhanças ou diferenças entre os compartimentos dos FBPs. As características avaliadas no lodo foram: massa de STV (kg) por compartimento dos FBPs, concentração de DNA por STV (ng/g), número de cópias de genes por grama de STV (AOB, anammox, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, desnitrificantes e bactérias totais), porcentagem de STV por grama de lodo fresco e as bandas observadas nos perfis de DGGE de bactérias em geral (Apêndice E). Os valores de concentração de DNA e de genes por grama de STV foram transformados em logaritmo (na base 10) e utilizados nos cálculos. Os resultados da PCA mostraram que os três primeiros componentes explicaram 52% da variação entre os compartimentos dos FBPs (Tabela 6.5).

Tabela 6.5 – Análise de componentes principais com base nas características dos lodos: autovalores (*eigenvalues*) e porcentagens da variação explicadas por cada componente

Componentes principais (CPs)	Autovalores	Porcentagem absoluta (%)	Porcentagem acumulada (%)
CP ₁	9,115	25,3	25,3
CP ₂	5,784	16,1	41,4
CP ₃	3,762	10,4	51,8

Embora as características dos efluentes no FBP de espuma tenham variado muito entre os pontos, o mesmo não foi observado em termos de biomassa. No gráfico da Figura 6.18, elaborado a partir dos dois primeiros componentes (CP₁ e CP₂), observou-se que os compartimentos do FBP de espuma (circulados em azul) estão muito mais próximos que os do FBP de placas (circulados em verde).

Figura 6.18– Análise de componentes principais com base nas características físico-químicas e biológicas dos lodos. Os três primeiros componentes explicaram 52% das variações entre os compartimentos



- Legenda das amostras de lodo: **S** → FBP de espuma **P** → FBP de placa
- | | | |
|--|--|--|
| S1(1) : profundidade 1,05 m em P1 | S3(3) : profundidade 3,15 m em P3 | P2(2) : profundidade 2,10 m em P2 |
| S1(2) : profundidade 1,05 m em P2 | S4(1) : profundidade 4,20 m em P1 | P2(3) : profundidade 2,10 m em P3 |
| S1(3) : profundidade 1,05 m em P3 | S4(2) : profundidade 4,20 m em P2 | P3(1) : profundidade 3,15 m em P1 |
| S2(1) : profundidade 2,10 m em P1 | S4(3) : profundidade 4,20 m em P3 | P3(2) : profundidade 3,15 m em P2 |
| S2(2) : profundidade 2,10 m em P2 | P1(1) : profundidade 1,05 m em P1 | P3(3) : profundidade 3,15 m em P3 |
| S2(3) : profundidade 2,10 m em P3 | P1(2) : profundidade 1,05 m em P2 | P4(1) : profundidade 4,20 m em P1 |
| S3(1) : profundidade 3,15 m em P1 | P1(3) : profundidade 1,05 m em P3 | P4(2) : profundidade 4,20 m em P2 |
| S3(2) : profundidade 3,15 m em P2 | P2(1) : profundidade 2,10 m em P1 | P4(3) : profundidade 4,20 m em P3 |

Estes resultados mostram que, em termos de característica do lodo (perfis de bandas de DGGE, massa de STV por compartimento, concentração de bactérias/ g de STV, etc.), o FBP

de espuma sofreu menos alterações que o de placa. O fato de o FBP de espuma reter maior quantidade de sólidos pode ter sido o fator mais influente na sua estabilidade funcional e eficiência de remoção/conversão de compostos orgânicos e nitrogenados, principalmente com relação à ação de predadores e ao desprendimento (perdas) de biomassa, conforme discutido no item 6.2.1. De fato, a variável kg de STV/ compartimento apresentou alto valor de correlação ($-0,82$) na CP_1 , que explicou 25,3% da variação entre os compartimentos.

6.3.4 Análise de componentes principais com base em todas as características dos lodos e dos efluentes

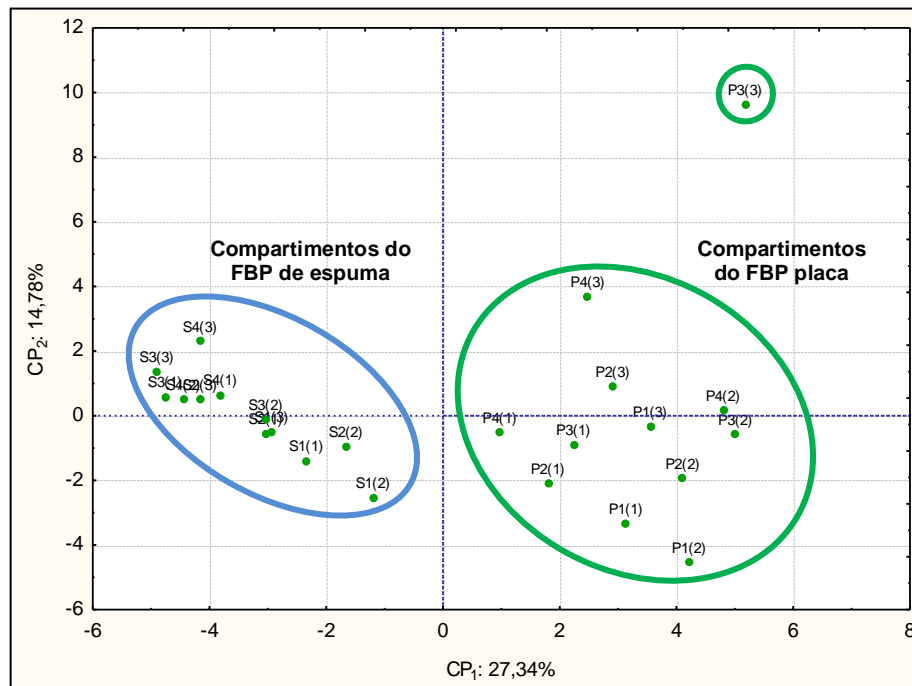
Uma terceira PCA foi realizada com todas as características dos efluentes e dos lodos amostrados. Os resultados mostraram que os três primeiros componentes explicaram cerca de 51,2% da variação entre os FBPs (Tabela 6.6).

Tabela 6.6 – Análise de componentes principais com base nas características dos efluentes e dos lodos: autovalores (*eigenvalues*) e porcentagens da variação explicadas por cada componente

Componentes principais (CPs)	Autovalores	Porcentagem absoluta (%)	Porcentagem acumulada (%)
CP_1	13,399	27,3	27,3
CP_2	7,240	14,8	42,1
CP_3	4,482	9,1	51,2

O gráfico elaborado a partir de CP_1 e CP_2 (Figura 6.19) mostrou novamente que os compartimentos do FBP de placa (circulados em verde) são bem distintos do FBP de espuma (circulados em azul). A dispersão entre os compartimentos do FBP de espuma foi que menor que a observada entre os do FBP de placa. Ainda, a organização das amostras neste gráfico foi mais semelhante àquela observada no gráfico baseado nas características do lodo, o que significa que as variações entre os compartimentos dos FBPs foram mais influenciadas pelas características do lodo do que propriamente pelas características dos efluentes. Conforme discutido anteriormente, a maior retenção de sólidos pelo FBP de espuma foi um dos fatores responsáveis pela menor variação observada entre os compartimentos.

Figura 6.19 – Análise de componentes principais com base em todas as características dos efluentes e dos lodos. Os três primeiros componentes explicaram 51,3% das variações entre os compartimentos



Legenda dos compartimentos: S → FBP de espuma		P → FBP de placa
S1(1) : profundidade 1,05 m em P1	S3(3) : profundidade 3,15 m em P3	P2(2) : profundidade 2,10 m em P2
S1(2) : profundidade 1,05 m em P2	S4(1) : profundidade 4,20 m em P1	P2(3) : profundidade 2,10 m em P3
S1(3) : profundidade 1,05 m em P3	S4(2) : profundidade 4,20 m em P2	P3(1) : profundidade 3,15 m em P1
S2(1) : profundidade 2,10 m em P1	S4(3) : profundidade 4,20 m em P3	P3(2) : profundidade 3,15 m em P2
S2(2) : profundidade 2,10 m em P2	P1(1) : profundidade 1,05 m em P1	P3(3) : profundidade 3,15 m em P3
S2(3) : profundidade 2,10 m em P3	P1(2) : profundidade 1,05 m em P2	P4(1) : profundidade 4,20 m em P1
S3(1) : profundidade 3,15 m em P1	P1(3) : profundidade 1,05 m em P3	P4(2) : profundidade 4,20 m em P2
S3(2) : profundidade 3,15 m em P2	P2(1) : profundidade 2,10 m em P1	P4(3) : profundidade 4,20 m em P3
	P2(2) : profundidade 2,10 m em P2	
	P2(3) : profundidade 2,10 m em P3	
	P3(1) : profundidade 3,15 m em P1	
	P3(2) : profundidade 3,15 m em P2	
	P3(3) : profundidade 3,15 m em P3	
	P4(1) : profundidade 4,20 m em P1	
	P4(2) : profundidade 4,20 m em P2	
	P4(3) : profundidade 4,20 m em P3	

Estes resultados sugerem que as menores variações nas características do FBP de espuma, particularmente da biomassa, podem ser o fator responsável pela sua maior estabilidade funcional na remoção/conversão de substratos em relação ao FBP de placas, mostrando uma maior capacidade de resistência a variações ambientais, tais como variações nas concentrações afluentes de substratos, ação de predadores, etc.

6.3.5 Conclusões do item 6.3

A configuração do meio-suporte influenciou sobremaneira na distribuição de substratos e no desempenho dos FBPs. A menor variação das características entre os compartimentos do FBP de espuma, influenciada principalmente pela quantidade de STV, mostrou que o meio-suporte de espuma conferiu maior robustez e estabilidade funcional ao reator.

Com relação ao ciclo do nitrogênio, o grupo de bactérias desnitrificantes foi o predominante e diminuíram do topo para o fundo em ambos os FBPs, coerente com a redução da matéria orgânica. As abundâncias relativas de nitrificantes foram maiores no FBP de placa. Em termos absolutos, devido à maior retenção de STV, o meio-suporte de espuma reteu maior quantidade de nitrificantes. Além disso, o desenvolvimento de anammox foi mais bem-sucedido no FBP de espuma, sugerindo inclusive dominância sobre AOB em P3.

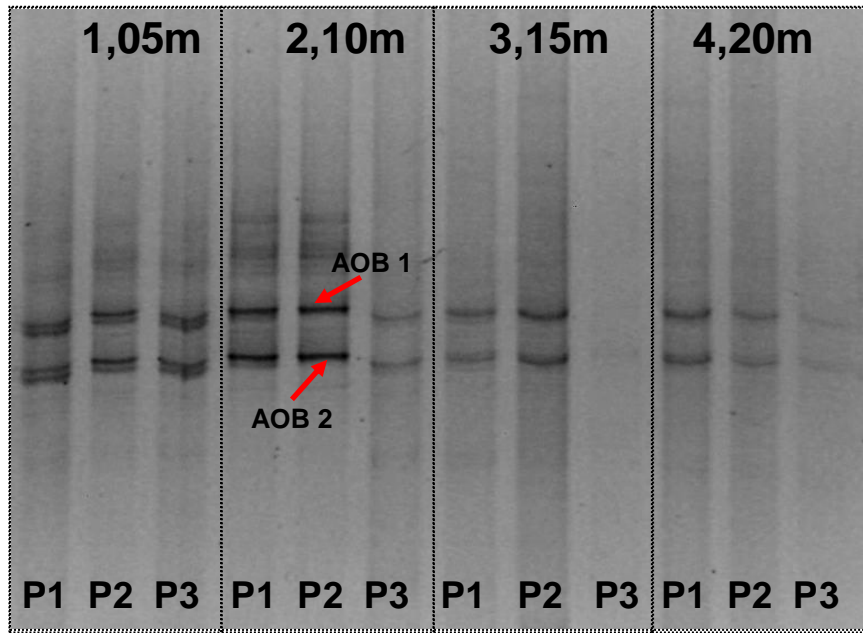
Esses resultados indicaram que a oxidação de N-amoniaco no FBP de placa foi principalmente via AOB, enquanto que no FBP de espuma, coexistiam AOB e anammox. Esta conclusão confirma a hipótese 2, que afirma que o FBP de espuma é mais eficiente em reter maior quantidade de micro-organismos de crescimento lento envolvidos na oxidação da amônia. Além disso, a hipótese 3 foi confirmada com a observação simultânea de micro-organismos envolvidos nos processos de desnitrificação, nitrificação e Anammox no FBP de espuma.

As populações de nitrificantes e anammox não se reduziram em P2, mostrando que o aumento da COV não inibiu o seu desenvolvimento. Isso nega a hipótese 5, que afirma que o aumento da COV aplicada provocaria redução da comunidade nitrificante em virtude do desenvolvimento de bactérias heterotróficas, enquanto que a redução, provocaria o aumento da comunidade de bactérias nitrificantes.

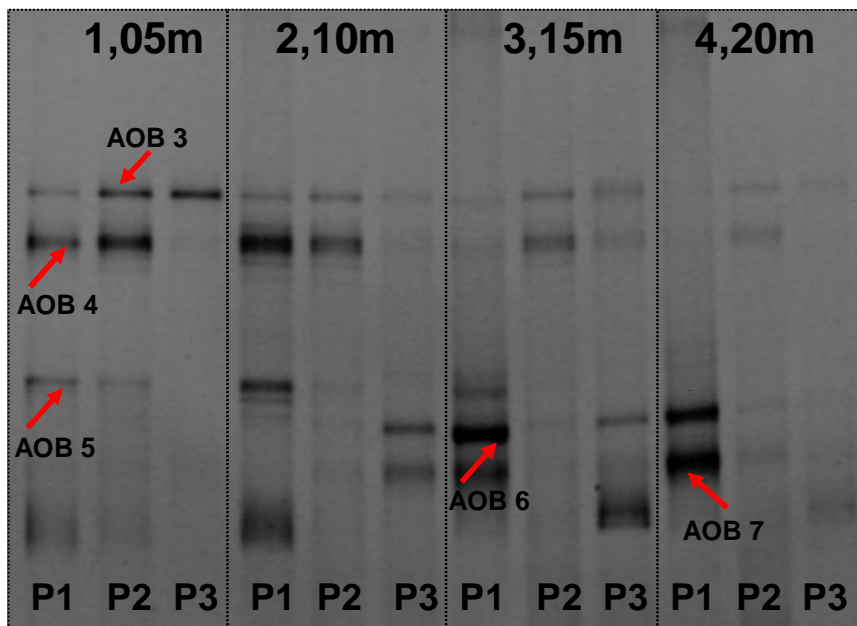
6.4 Caracterização e comparação da comunidade de AOB por DGGE

Analisando-se a Figura 6.20A, observa-se que os perfis de bandas de AOB (obtidos através de PCR-DGGE) encontrados no FBP preenchido por placa foram similares em todas as profundidades e em todos os períodos amostrados. O FBP preenchido por espuma apresentou perfis de bandas diferentes (Figuras 6.20B e C), mostrando a predominância de três populações (AOB3, AOB4, AOB5) nos compartimentos superiores (1,05 e 2,10 m) e duas (AOB6 e AOB7) nos inferiores (3,15 e 4,20 m).

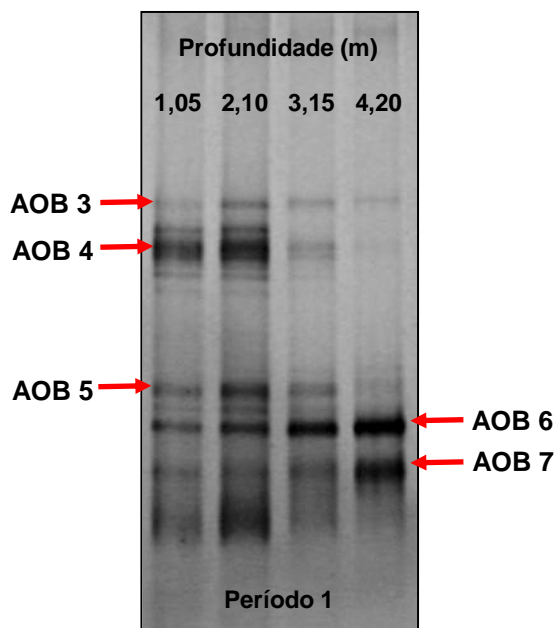
Figura 6.20 – Perfis populacionais de AOB nas diferentes profundidades de ambos os FBPs nos três períodos amostrados



(A) FBP preenchido por placas. Bandas indicadas pela seta vermelha fora excisadas e sequenciadas



(B) FBP preenchido por espuma. Bandas indicadas pela seta vermelha fora excisadas e sequenciadas



(C) Repetição da análise de DGGE dos perfis populacionais de AOB das amostras coletadas no primeiro período. Observar a estratificação das bandas, com predomínio de populações relacionadas a *Nitrosomonas europaea* nos compartimentos superiores e as relacionadas a *Nitrosomonas oligotropha* nos compartimentos inferiores.

As sequências parciais de genes *amoA* identificadas, obtidas das bandas de DGGE, foram então comparadas com aquelas presentes no BLAST (Tabela 6.7). Todas as bandas, exceto AOB5 e AOB7, apresentaram 99% de similaridade com sequências da ordem *Nitrosomonadales*.

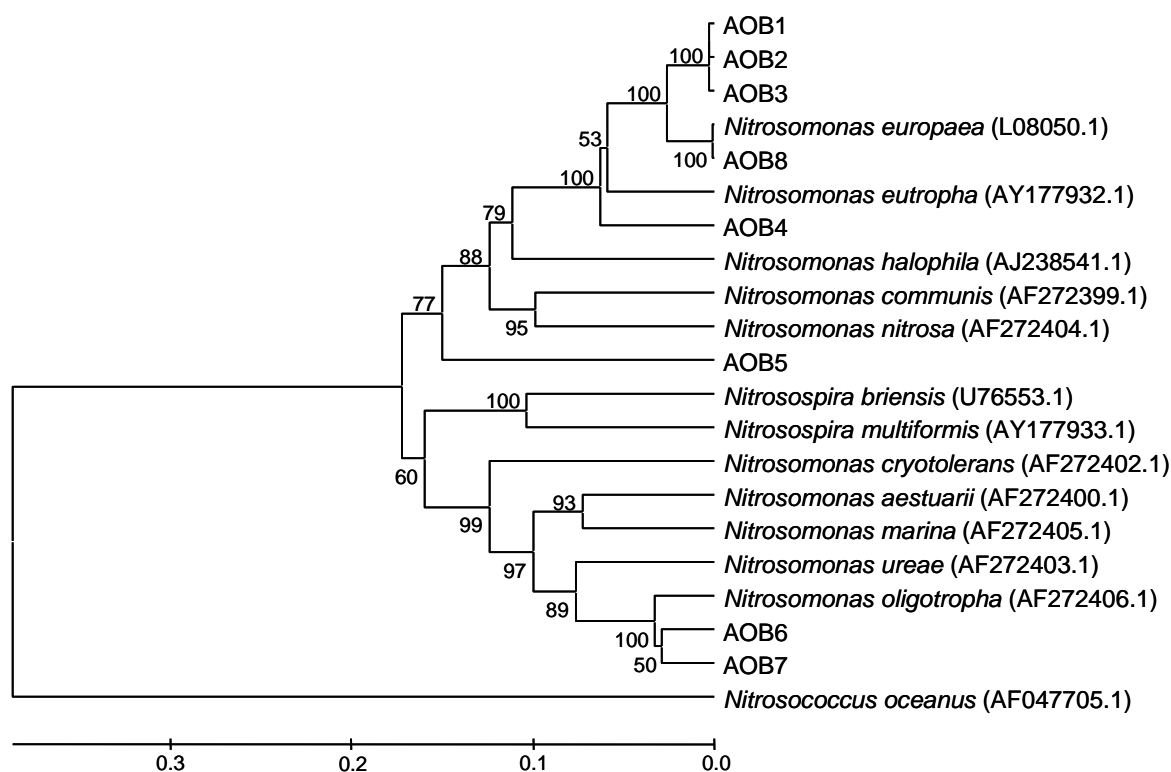
Tabela 6.7 – Identificação das bandas de DGGE associadas às Figuras 6.20A e 6.20B, tendo, como gene-alvo, parte do gene *amoA*.

Origem da amostra	Banda	Ordem mais próxima	Nº de acesso	Gene <i>amoA</i>	Similaridade*
FBP de placa	AOB1	<i>Nitrosomonadales</i>	JX233574	Sequência isolada de sistema de tratamento de água residuária	99%
FBP de placa	AOB2	<i>Nitrosomonadales</i>	HQ822002	Sequência isolada de um sistema de lodos ativados	99%
FBP de placa	AOB3	<i>Nitrosomonadales</i>	HQ832683	Sequência de isolada de um sistema-piloto de bioaumentação para tratar efluente farmacêutico	99%
FBP de placa	AOB4	<i>Nitrosomonadales</i>	GQ911477	Sequência isolada de raízes de macrófitas aquáticas flutuantes (WEI <i>et al.</i> , 2011)	99%
FBP de espuma	AOB5	<i>Nitrosomonadales</i>	EU708496	Sequência isolada de biorreator nitrificante em escala plena tratando efluente salino	90%
FBP de espuma	AOB6	<i>Nitrosomonadales</i>	EF431865	Sequência isolada de ETE municipal e de tratamento de efluente de suinocultura	99%
FBP de espuma	AOB7	<i>Nitrosomonadales</i>	EU852714	Sequência isolada de sistema de tratamento de águas subterrâneas e de distribuição de água potável	97%

*as porcentagens representam similaridades entre a sequência da banda do DGGE com as sequências mais próximas no GenBank.

Uma árvore filogenética foi construída para comparação das sequências isoladas com sequências parciais de *amoA* de espécies de AOB já conhecidas e descritas (Figura 6.21). As duas populações principais (AOB1 e AOB2), identificadas no FBP de placas, relacionadas filogeneticamente a *Nitrosomonas europaea*. As populações identificadas nos compartimentos superiores do FBP de espuma (Figura 6.20) foram relacionadas com *Nitrosomonas europaea* (AOB3) e *Nitrosomonas eutropha* (AOB4). As populações presentes nos compartimentos inferiores (AOB6 e AOB7) foram relacionadas a *Nitrosomonas oligotropha* (cerca de 96,4% de similaridade). Tais linhagens são comumente encontradas em sistemas de tratamento de efluentes em escala plena (SIRIPONG & RITTMAN, 2007; LIMPIYAKORN *et al.*, 2005; LYDMARK *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2012b). A banda AOB5 foi a única que apresentou similaridade muito baixa com sequências do gene *amoA* de espécies de *Nitrosomonas* conhecidas (cerca de 85%), portanto podendo indicar uma sequência nova.

Figura 6.21 – Associação filogenética das bandas do DGGE elaborada a partir de sequências parciais do gene *amoA* de AOB recuperadas de ambos os FBPs.



A barra de escala representa 10% de divergência entre as sequências. A árvore filogenética foi construída no programa MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007). Foi realizado o teste de *Bootstrap* (500 recombinações) com o método de UPGMA. A sequência AOB8 é referente ao plasmídeo recombinante utilizado nos ensaios de PCR em tempo real.

Em termos de concentrações de substratos ao longo dos períodos de monitoramento, observou-se que as flutuações ocorridas em cada período não alteraram a estrutura da comunidade de AOB no FBP de placas. A menor retenção de micro-organismos, bem como as menores mudanças em termos de concentrações de substratos ao longo das profundidades deste FBP (Figura 6.9) refletiram nas poucas populações encontradas, que estariam mais adaptadas às condições ambientais oferecidas pelo meio suporte de placas.

A predominância de diferentes linhagens ao longo do FBP de espuma foi provocada pelas diferentes concentrações de $N-NH_4^+$ e condições ambientais presentes nos compartimentos do FBP preenchido por espuma. Alguns estudos na literatura reportaram o predomínio de *Nitrosomonas europaea* e *Nitrosomonas eutropha* em ambientes eutrofizados e ricos em $N-NH_4^+$, e o de *N. oligotropha* em ambientes com baixos a moderado níveis (LIMPIYAKORN *et al.*, 2005; LYDMARK *et al.*, 2006). Estes resultados estão coerentes com os de perfis físico-químicos (Figura 6.10), nos quais as concentrações de $N-NH_4^+$, OD e alcalinidade presentes em cada compartimento eram diferentes, reduzindo do topo para o fundo.

Os perfis de DGGE (observados na Figura 6.37B) mostraram uma relação de r e K-estrategista entre as populações de *Nitrosomonas*. Observou-se que populações relacionadas a *N. europaea* predominaram nos compartimentos superiores do FBP nos momentos de maior COV aplicada (P1 e P2). Com a redução das concentrações de N-NH₄⁺ em virtude da redução significativa de COV em P3, ocorreu redução na diversidade de AOB na primeira profundidade (1,05 m) e, na segunda profundidade (2,15 m), houve uma tendência de inversão das populações predominantes para *N. oligotropha*, que apresentam vantagem competitiva em situações de baixas concentrações de N-NH₄⁺. Neste período ocorreu redução das populações de AOB somente na primeira profundidade (Figura 7.20B).

6.4.1 Conclusões do item 6.4

O meio suporte de espuma promoveu uma diversificação de populações de AOB ao longo das profundidades do FBP. As maiores concentrações de matéria orgânica e de N-NH₄⁺ promoveram a seleção de populações relacionadas a *Nitrosomonas europaea*/*N. eutropha* nos compartimentos superiores do FBP (1,05 e 2,10m), enquanto que nos compartimentos inferiores (3,15 e 4,20m), populações relacionadas a *N. oligotropha*, adaptadas a menores concentrações de N-NH₄⁺. No FBP de placa, foram encontradas somente duas populações predominantes relacionadas a *N. europaea*. A menor diversidade de bandas de AOB encontradas nesse FBP foi atribuída ao seu menor potencial de retenção de micro-organismos e às menores mudanças em termos de concentrações de substratos ao longo do filtro. Esta conclusão confirma parcialmente a hipótese 1, pois apesar dos FBPs apresentarem configurações diferentes, duas populações eram comuns em ambos os filtros. Os resultados do FBP de placa negam a hipótese 4, uma vez que não foram observadas diferenças das populações de AOB entre as profundidades e os períodos monitorados no filtro, entretanto a mesma hipótese foi confirmada com os resultados do FBP de espuma.

6.5 Caracterização da comunidade bacteriana desenvolvida em cada tipo de meio-suporte por pirosequenciamento

6.5.1 Caracterização da comunidade bacteriana em nível de filo

Das oito amostras de DNA analisadas (discriminadas na Tabela 5.5), foram obtidas 25.065 sequências (média de 3.133 sequências/ amostra). Os filós mais abundantes foram *Proteobacteria* (44,4 ± 7,6%), *Verrucomicrobia* (20,0 ± 12,9%), *Planctomycetes* (8,2 ± 4,6%),

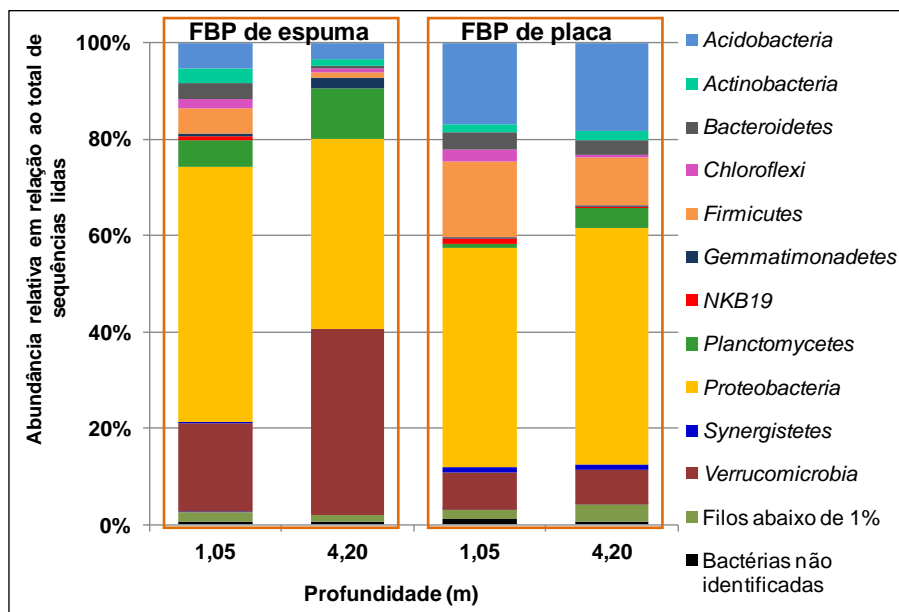
Acidobacteria (8,1 ± 6,1%), *Firmicutes* (6,0 ± 4,9%), *Actinobacteria* (2,2 ± 1,6%), *Bacteroidetes* (2,0 ± 1,3%), *Chloroflexi* (2,1 ± 2,3%) e *Gemmatimonadetes* (1,7 ± 1,9%). Dentro do filo *Proteobacteria*, as classes mais abundantes foram *Alphaproteobacteria* (52,5 ± 6,5%), *Gammaproteobacteria* (28,3 ± 10,5%), *Betaproteobacteria* (13,6 ± 7,2%) e *Deltaproteobacteria* (5,2 ± 2,5%).

Bacteroidetes e *Firmicutes* são os principais filos encontrados na microbiota intestinal humana (BACKHED *et al.*, 2005; ECKBURG *et al.*, 2005), sendo os gêneros mais frequentes: *Cytophaga*, *Flavobacterium* e *Bacteroides* (filo *Bacteroidetes*) e *Clostridium* e *Eubacterium* (filo *Firmicutes*). O filo *Proteobacteria* é comum neste ambiente, mas usualmente não é o dominante (inclusive *Escherichia coli*). Sequências dos filos *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* são relativamente raras.

Em esgotos brutos, estudos indicam que os filos predominantes são *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (MA *et al.*, 2013, SHANKS *et al.*, 2013; Tabela 5.3), o que é coerente, uma vez que estes são oriundos da matéria orgânica fecal, basicamente de origem humana. Os gêneros *Bacteroides*, *Clostridium* e *Eubacterium* são de bactérias anaeróbias obrigatórias, fermentadores de açúcares e aminoácidos e, por isso, a presença e predominância destas bactérias também se justificam em sistemas de tratamento anaeróbios (MA *et al.*, 2013). No presente estudo, porém, poucas sequências destes gêneros foram encontradas (menos de 0,5%) e observou-se a predominância de filos que são raros na microbiota humana (*Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Actinobacteria*, Figura 6.22) em ambos os FBPs, o que denota a ocorrência de uma mudança total e completa na comunidade bacteriana ao longo do sistema de tratamento de esgotos domésticos.

Uma das diferenças observadas entre os FBPs foi a maior detecção de membros do filo *Synergistetes* no FBP de placa. Estas bactérias são estritamente anaeróbias e fermentadoras de aminoácidos. Têm sido encontradas, embora como constituintes minoritários, numa ampla variedade de habitats anaeróbios, tais como trato gastrointestinal de insetos, sistemas de tratamento de esgotos, solos, poços de óleo, além de estarem implicadas em doenças periodontais em humanos (HUGENHOLTZ *et al.*, 2009).

Figura 6.22 – Composição da comunidade bacteriana, em nível de filo, presente em ambos FBP em P1, conforme os resultados de pirosequenciamento



6.5.1.1 Análises estatísticas com índices de diversidade α

A Tabela 6.8 apresenta o número de sequências lidas, com similaridades maiores que 97% na região V4 do RNAr 16S de bactérias em geral, e o número de grupos taxonômicos analisados pelos índices de diversidade, assim como também na análise de PCA (item 6.5.1.2). As OTUs foram definidas até o nível taxonômico mais aprofundado possível. Muitas sequências (a maioria) não estavam classificadas até o nível de espécie ou gênero, por questão de limitação na identificação genética. Dessa forma, foi necessário assumir que OTUs identificadas desde o nível de família até filo representavam um só indivíduo, inclusive sequências de bactérias ainda desconhecidas. As sequências foram distribuídas num total 427 OTUs, entretanto, considerando as amostras individualmente, o total de grupos taxonômicos é variável, pois nem todas as OTUs foram detectadas em cada amostra e outras, foram específicas de algum(ns) compartimento(s) ou do tipo de FBP.

Os resultados dos índices de Shannon, Simpson e Chao 1 (Tabela 6.8) mostraram que a diversidade diminuiu do topo para o fundo do FBP de espuma em P1. Estes valores estão coerentes com Missaglia (2010), que também encontrou maior diversidade de organismos no topo dos reatores. A maior diversidade no topo é justificada pela maior variedade e disponibilidade de substratos (energia luminosa, matéria orgânica, íon amônio, alcalinidade, etc.), o que permite o desenvolvimento de micro-organismos diversos tipos metabólicos.

Em P3, todos os índices indicaram que a diversidade se manteve maior em relação ao fundo do FBP de espuma. Alguns índices indicaram que a diversidade e a equitabilidade aumentaram tanto no topo quanto no fundo em relação a P1 (por exemplo, Shannon e Evenness), enquanto que o índice de Chao 1 indicou que a riqueza diminuiu. Ou seja, em P1 havia maior riqueza de grupos menos abundantes que em P3, tanto no topo quanto no fundo do FBP. Isto significa esses grupos provavelmente desapareceram ao longo do tempo ou, o contrário, ocorreu aumento no número de indivíduos dentro destes grupos, reduzindo assim o número de *singletons* ou *doubletons* para o cálculo do índice de Chao 1.

Tabela 6.8 – Análise da diversidade das amostras de ambos os FBPs por meio de índices de diversidade α

	S1 (1)	S2(1)	S3(1)	S4(1)	S1(3)	S4(3)	P1(1)	P4(1)
Número de sequências lidas	2925	2840	3443	3731	2858	3091	3284	2894
Número de grupos taxonômicos	217	182	150	147	191	163	177	206
Dominância (D)	0,03	0,04	0,09	0,09	0,02	0,05	0,04	0,04
Simpson ($D' = 1-D$)	0,97	0,96	0,91	0,91	0,98	0,95	0,96	0,96
Shannon (H')	4,23	4,05	3,62	3,44	4,39	3,75	3,92	4,07
Chao 1	255,6	235,5	171,4	169,2	218,4	211,2	198,5	255,1
Evenness ($e^{H'/S}$)	0,32	0,31	0,25	0,21	0,42	0,26	0,28	0,29
Equitabilidade (J)	0,79	0,78	0,72	0,69	0,84	0,74	0,76	0,76

Dominância: quanto mais próximo de 1, menor a diversidade da amostra

Simpson: quanto mais próximo de 1, maior a diversidade da amostra

Shannon: quanto maior o valor, maior a diversidade da amostra

Chao 1: quanto maior o valor, maior a diversidade da amostra

Evenness e equitabilidade: quanto mais próximo de 1, maior uniformidade (igualdade) de indivíduos entre os grupos taxonômicos

Legenda:

S → FBP de espuma

S1(1): profundidade 1,05 m no período 1

S2(1): profundidade 2,10 m no período 1

S3(1): profundidade 3,15 m no período 1

S4(1): profundidade 4,20 m no período 1

P → FBP de placa

S1(3): profundidade 1,05 m no período 3

S4(2): profundidade 4,20 m no período 3

P1(1): profundidade 1,05 m no período 1

P4(1): profundidade 4,20 m no período 1

Ao se comparar os valores de Simpson (D') e de Shannon (H'), observou-se que os de Simpson foram menos discriminantes que os de Shannon. Os valores de D' foram semelhantes para os dois primeiros compartimentos do FBP de espuma em P1 (0,97 e 0,96) e iguais para os dois últimos (0,91) em P1 e para os compartimentos do FBP de placas (0,96). O índice também indicou aumento da diversidade em P3 no FBP de espuma (0,98 para o topo e 0,95 para o fundo). Isto ocorreu porque o índice de Simpson atribui maior peso às espécies (no caso, grupos taxonômicos) mais abundantes, sendo conseqüentemente mais sensível a

mudanças que ocorrem nestes grupos. O índice de Shannon, por outro lado, é influenciado pela riqueza de espécies, considerando inclusive aquelas que contêm apenas um indivíduo (MAGURRAN, 1988).

Com relação ao FBP de placa, os valores dos índices de Simpson e Shannon foram semelhantes (respectivamente, 0,96 e em torno de 4,0), mostrando que não havia diferenças significantes na diversidade entre topo e fundo do FBP. O mesmo ocorreu para os índices de dominância, Evenness e equitabilidade. Entretanto, no caso do índice de Chao 1, os resultados foram bem diferentes (topo: 198,5 e fundo: 255,1), indicando que o fundo apresentava maior riqueza de grupos taxonômicos menos abundantes que o topo do FBP. Não obstante, o fato de a diversidade ter sido semelhante ao longo do FBP de placa, conforme mostrado pela maioria dos índices de diversidade α , pode ter sido em virtude da pouca diversificação das condições ambientais oferecida pelo meio-suporte.

6.5.1.2 Análise de componentes principais

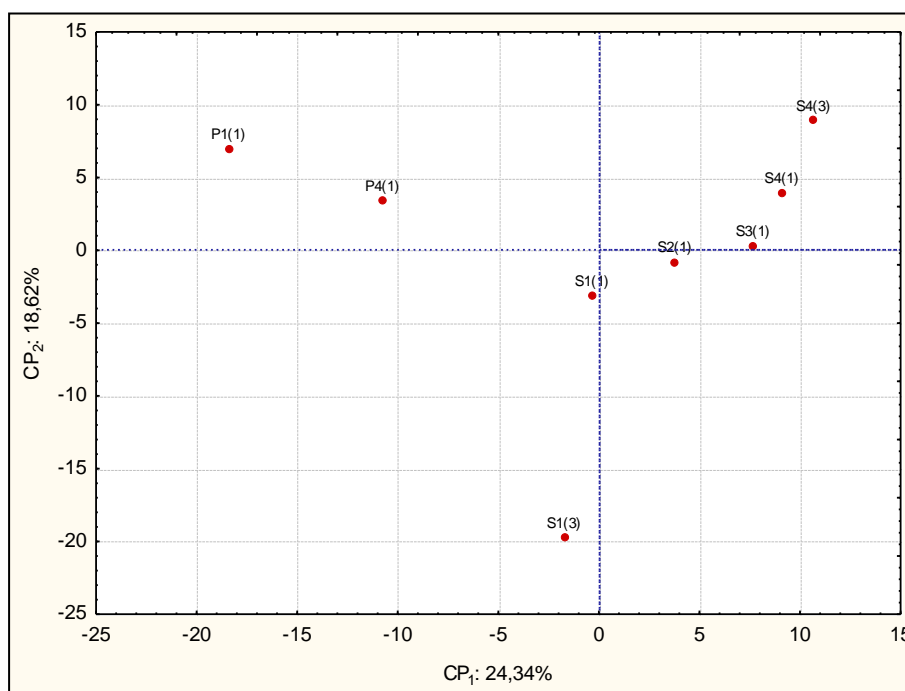
Para se avaliar diferenças entre os compartimentos dos FBPs em termos de estrutura da comunidade bacteriana, utilizou-se a PCA, uma vez que as medidas de diversidade α não são capazes de descrever o quanto as comunidades eram distintas (ou similares) entre si em termos de composição de espécies. A organização das sequências foi a mesma utilizada para o cálculo dos índices de diversidade, ou seja, 427 OTUs (item 6.5.1.1). Os resultados mostraram que os três primeiros componentes explicaram 57,5% da variação entre os FBPs (Tabela 6.9).

Tabela 6.9 – Análise de componentes principais com base em todos os táxons do pirosequenciamento: autovalores (*eigenvalues*) e porcentagens da variação explicadas por cada componente

Componentes principais (CPs)	Autovalores	Porcentagem absoluta (%)	Porcentagem acumulada (%)
CP ₁	104,304	24,3	24,3
CP ₂	78,835	18,6	42,9
CP ₃	63,091	14,7	57,6

Os compartimentos do FBP de espuma em P1 apresentaram uma evolução da comunidade bacteriana do topo para o fundo (Figura 6.23). Comparando-se os FBPs em P1, observa-se que a distância entre topo e fundo foi maior no FBP de espuma, mostrando que as estruturas das comunidades bacterianas eram mais diferentes que no FBP de placas.

Figura 6.23 – Análise de componentes principais com base nos grupos taxonômicos detectados no pirosequenciamento. Os três primeiros componentes explicaram 57,5% das variações entre os compartimentos



Legenda:

S → FBP de espuma

P → FBP de placa

S1(1): profundidade 1,05 m no período 1

S1(3): profundidade 1,05 m no período 3

S2(1): profundidade 2,10 m no período 1

S4(2): profundidade 4,20 m no período 3

S3(1): profundidade 3,15 m no período 1

P1(1): profundidade 1,05 m no período 1

S4(1): profundidade 4,20 m no período 1

P4(1): profundidade 4,20 m no período 1

Analisando-se o FBP de espuma ao longo do tempo, observou-se que a distância no espaço bidimensional entre topo e fundo foi maior em P3, mostrando maiores variações na estrutura da comunidade bacteriana. Estas variações foram maiores no topo do FBP, uma vez que a distância foi maior entre os pontos do S1 (1) e S1(3) do que entre os pontos S4(1) e S4(3).

6.5.2 Caracterização da comunidade de bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio

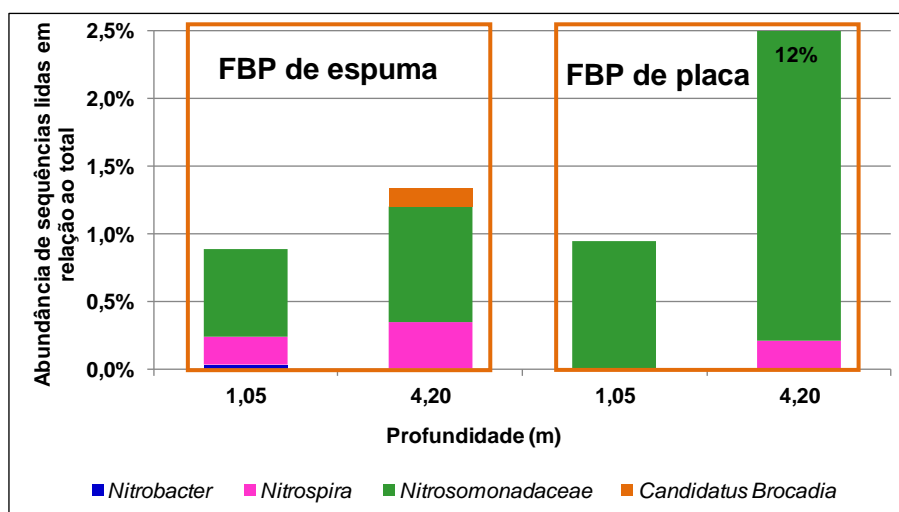
Para realizar uma discussão centrada no ciclo do nitrogênio, foram elaborados gráficos (Figuras 6.24, 6.25, 6.27, 6.28, 6.30, 6.31) com sequências, obtidas no pirosequenciamento, identificadas até o nível de gênero e família de bactérias reconhecidamente nitrificantes, de bactérias anammox e de desnitrificantes. Entretanto, houve várias sequências de microorganismos desconhecidos ou ainda não-cultivados, inclusive algumas bem frequentes (mais de 10% de abundância relativa), dos quais pouco se sabe sobre seu metabolismo ou nicho ecológico. Além disso, há várias sequências identificadas até o nível de ordem ou família que

poderiam incluir gêneros de bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio, o que pode estar subestimando os resultados.

6.5.2.1 Caracterização da comunidade de AOB, NOB e anammox

Analisando-se as sequências de populações nitrificantes, observou-se que, com exceção do fundo do FBP de placas (4,20 m), foram detectadas poucas sequências de AOB e NOB (menos de 1,5% de abundância em relação ao total de sequências; Figura 6.24). O principal grupo de AOB detectado foi o pertencente à família *Nitrosomonadaceae*. Os possíveis gêneros incluídos nesse grupo são *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*. Em P1, dentre as amostras analisadas, esta família foi a mais abundante no fundo do FBP de placas (12% da abundância relativa). Embora as porcentagens relativas de *Nitrosomonadaceae* no FBP de placas tenham sido maiores, o FBP de espuma apresentou maiores quantidades absolutas de membros desse grupo, considerando o volume de STV retido nas espumas do meio-suporte. Portanto, esse é um dos fatores que explicam as maiores eficiências de remoção de $N-NH_4^+$ pelo FBP de espuma.

Figura 6.24 – Composição da comunidade de AOB, NOB e anammox encontrados no topo e no fundo de ambos os FBPs em P1, conforme resultados do pirosequenciamento.



A ocorrência de bactérias anammox no meio-suporte de espuma foi confirmada com a detecção de sequências do gênero *Candidatus Brocadia* no fundo do FBP. Isto significa que uma vez que o meio-suporte proporcionou condições ambientais (por exemplo, micro-nichos anóxicos) para o desenvolvimento desses micro-organismos.

A ocorrência de outros processos biológicos envolvidos na remoção de N-NH_4^+ em sistemas de tratamento biológico tem sido citada em alguns trabalhos. Recentemente, Bassin *et al.* (2012) sugeriram que parte das perdas de nitrogênio observadas em sistema nitrificante (escala laboratorial) foi em decorrência da assimilação de N-NH_4^+ para crescimento microbiano (5 a 8% do N-NH_4^+ afluente). Além disso, os autores detectaram uma bactéria (relacionada a *Arthrobacter soli*) capaz de realizar nitrificação heterotrófica. Neste trabalho, entretanto, não foram encontradas sequências relacionadas a essa espécie ou gênero.

A baixa abundância de NOB contrastada com a presença de nitrato e baixíssimas concentrações efluentes de nitrito sugerem que a diversidade de NOB poderia estar sendo subestimada. Alguns tipos de sequências detectadas em nível de classe e ordem poderiam incluir outros grupos de NOB. Por exemplo, sequências da classe *Thermomicrobia*, detectados no FBP de espuma poderiam ser da espécie *Nitrolancetus hollandicus*, um oxidador de nitrito recentemente isolado de um reator nitrificante (SOROKIN *et al.*, 2012). Outra recente descoberta é a oxidação anaeróbia de nitrito por membros de *Thiocapsa* (ordem *Chromatiales*), uma bactéria fotoheterotrófica (SCHOTT *et al.*, 2010). De fato a comunidade de nitrificantes pode ainda ser maior, uma vez que sequências não identificadas da ordem *Chromatiales*, além de *Thiocapsa*, podem incluir outros gêneros de NOB (*Nitrococcus*) e de AOB (*Nitrosococcus*). Outro gênero de NOB praticamente não detectado por pirosequenciamento foi *Nitrobacter*. Discussão mais aprofundada sobre esse resultado está no item 6.7.4.

Observou-se que as abundâncias de nitrificantes (AOB+NOB) foram maiores no fundo do que no topo de ambos os FBPs, corroborando com os resultados de PCR em tempo real. Como discutido anteriormente, as concentrações de sulfeto encontradas em efluentes do reator UASB podem ter inibido o desenvolvimento de nitrificantes nos primeiros compartimentos dos FBPs. A presença de oxidadores de sulfeto obrigatórios e facultativos nos primeiros compartimentos (por exemplo, *Thiobacillus*, *Thiotrichaceae*, *Rhodobacter*; Figuras 6.25 e 6.26) teria, então, papel fundamental para desenvolvimento de nitrificantes ao longo dos FBPs.

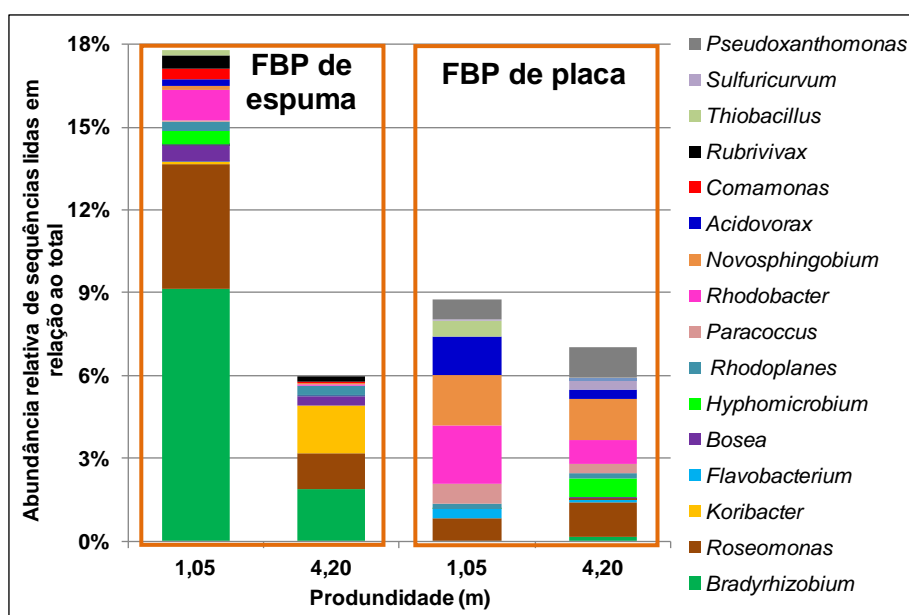
6.5.2.2 Caracterização da comunidade de bactérias desnitrificantes

De forma geral, observou-se a redução das abundâncias relativas de desnitrificantes do topo para o fundo do FBP de espuma (18,3% para 6,4%; Figura 6.25), enquanto que no FBP de

placas essa redução foi menos evidente (topo: 9,3%; fundo: 7,5%). Isto ocorreu porque a maioria das desnitrificantes encontradas é heterotrófica ou tem crescimento preferencialmente heterotrófico (Apêndice G; Tabela 0.6), predominando nas regiões superiores dos FBPs, onde havia maiores concentrações de matéria orgânica.

Estes resultados estão coerentes com os de Xie *et al.* (2012), que observaram maiores porcentagens relativas de desnitrificantes no topo da coluna do que no fundo de um biorreator utilizado na remoção de nitrogênio de lixiviado de aterro sanitário. Kubota *et al.* (2014) também encontraram diferenças marcantes na composição da comunidade microbiana nas diferentes alturas e em diferentes estações em um reator preenchido por espuma, que tratava efluente de reator UASB. Grupos taxonômicos envolvidos na remoção e matéria orgânica foram principalmente encontrados nas partes superiores do reator.

Figura 6.25 – Composição da comunidade de bactérias desnitrificantes encontradas no topo (1,05 m) e no fundo (4,20 m) de ambos os FBPs em P1, conforme resultados do pirosequenciamento.



A riqueza de OTUs foi semelhante entre topo e fundo de cada filtro, entretanto, as abundâncias relativas de cada OTU foram diferentes (Figura 6.25). Os grupos taxonômicos predominantes entre filtros também foram diferentes, embora havia alguns gêneros em comum (*Roseomonas*, *Rhodobacter* e *Hyphomicrobium*), configurando uma comunidade de desnitrificantes particular de cada filtro. No FBP de espuma, predominaram os gêneros *Roseomonas*, *Bradyrhizobium* e *Rubrivivax*. No FBP de placas, os gêneros predominantes foram *Rhodobacter*, *Novosphingobium*, *Acidovorax*, *Thiobacillus* e *Paracoccus*. Este

resultado confirmou a hipótese de que as condições ambientais proporcionadas por cada tipo de meio-suporte levou ao estabelecimento de comunidades bacterianas diferentes em ambos os FBPs.

O maior sucesso de *Bradyrhizobium* no FBP de espuma provavelmente deveu-se ao fato de serem micro-organismos quimiorganotróficos adaptadas a condições oligotróficas (ISHII *et al.*, 2011), embora observou-se uma redução da abundância desse gênero no fundo do reator (Figura 6.31). Essas bactérias são tipicamente encontradas em solo, onde formam associações simbióticas com plantas leguminosas e fixam N₂ atmosférico (MADIGAN *et al.*, 2010). As condições ambientais propiciadas pelo meio-suporte de espuma (por exemplo, capacidade de retenção de substratos, alto TRS e alto TDH) podem ter sido o fator fundamental para o desenvolvimento dessas bactérias, simulando condições encontradas em solo.

Outro gênero que teve maior sucesso no FBP de espuma foi *Roseomonas*, constituído por bactérias quimiorganotróficas, anaeróbias facultativas, **capazes de redução de nitrato a nitrito**, comumente isoladas de amostras clínicas de bacteremia e infecções humanas (JIANG *et al.* 2006). O gênero pertence à ordem *Rhodospirillales*, conhecida por incluir bactérias púrpuras, de metabolismo extremamente versátil, reconhecidamente **desnitrificantes**. Nos últimos anos, amostras de bactérias relacionadas ao gênero têm sido frequentemente isoladas de vários ambientes (JIANG *et al.* 2006). Martinez-Garcia *et al.* (2012) encontraram o gene *pfuM*, que codifica uma proteína do centro de reação de luz em bactérias fototróficas anoxigênicas, em genomas únicos amplificados relacionados a *Roseomonas*. Portanto, é plausível que *Roseomonas* também tenha as mesmas capacidades metabólicas que os outros integrantes da ordem *Rhodospirillales*.

6.5.2.3 Caracterização em termos de grupos taxonômicos mais abundantes

Segundo Nielsen *et al.* (2010), a composição exata de cada grupo funcional em um sistema de tratamento é primariamente determinada pela disponibilidade de substratos, mas se os substratos forem os mesmos, outros fatores influenciarão no resultado da competição dentro de um grupo ou entre grupos funcionais. Nielsen *et al.* (2010) observaram que, em estudo com vários sistemas para remoção de fósforo, a maioria dos grupos taxonômicos estavam presentes em quase todos os compartimentos dos sistemas de tratamento, porém em números variados. Isto indica que existe um número limitado de grupos taxonômicos centrais (*core*) e

que, apesar das variações em suas abundâncias serem significantes, eles constituem uma importante e frequente parte dominante das comunidades microbianas.

A definição de grupos taxonômicos centrais varia entre os autores. Lee *et al.* (2012) definiram como centrais as OTUs maiores que 3% do número total de sequências lidas. Um total de 31 OTUs obtidas a partir de 9051 foram eleitas como OTUs centrais e constituíam 36,4% do total de sequências. Wang *et al.* (2012a) considerou gêneros abundantes aqueles acima de 1%. No presente trabalho, observou-se que os grupos taxonômicos acima de 1% correspondiam mais da metade dos genes lidos nas amostras (Tabela 6.10). As porcentagens dos grupos dominantes (1 e 3%) aumentaram do topo para o fundo do FBP de espuma em P1 e P3, coerente com os resultados do índice de dominância *D* (Tabela 6.8). Entretanto, no FBP de placas, as porcentagens de OTUs dominantes foram maiores no topo do FBP, o que não foi mostrado pelo índice *D*.

Tabela 6.10 – Abundâncias relativas dos grupos taxonômicos predominantes (1 e 3%) nos FBPs

Abundância de OTUs (%)	S1 (1)	S2(1)	S3(1)	S4(1)	S1(3)	S4(3)	P1(1)	P4(1)
Acima de 1%	57,2	60,4	70,0	72,4	59,7	65,8	68,1	64,2
Acima de 3%	42,0	45,4	52,0	50,9	31,1	51,1	60,5	54,3

Legenda:

S → FBP de espuma

P → FBP de placa

S1(1): profundidade 1,05 m no período 1

S1(3): profundidade 1,05 m no período 3

S2(1): profundidade 2,10 m no período 1

S4(2): profundidade 4,20 m no período 3

S3(1): profundidade 3,15 m no período 1

P1(1): profundidade 1,05 m no período 1

S4(1): profundidade 4,20 m no período 1

P4(1): profundidade 4,20 m no período 1

Os resultados da Tabela 6.10 também mostram que diferenças entre topo e fundo do FBP de espuma eram maiores que no FBP preenchido por placa, reforçando a hipótese de que as diferentes condições ambientais proporcionadas pelo meio-suporte (por exemplo, diferenças substanciais nas concentrações de substratos, alto TRS e TDH) ao longo do reator foram responsáveis pela diversificação e seleção de micro-organismos no FBP de espuma.

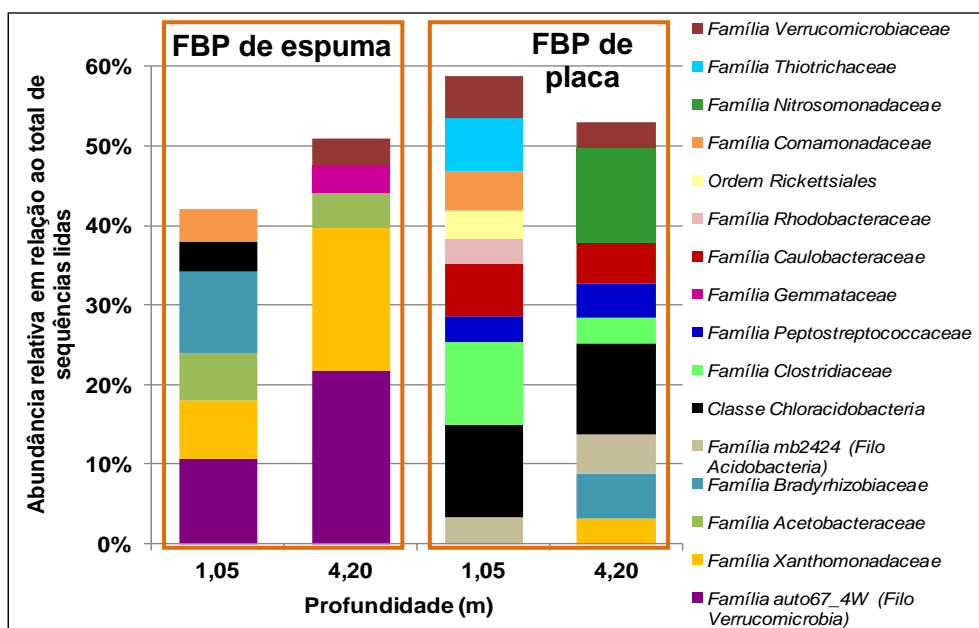
Com o objetivo de explorar a fisiologia dos micro-organismos predominantes e compreender um pouco sobre os processos biológicos principais que ocorriam nos FBPs, foram consideradas as OTUs em nível de família acima de 3% (em pelo menos uma amostra) como grupos centrais. Isto porque a maioria das OTUs foi identificada até o nível de família e, embora existam famílias que exibem uma variedade de gêneros com características

fisiológicas diferentes, as famílias foram caracterizadas com base no(s) gênero(s) mais abundante(s) (Apêndice G; Tabela 0.6). Outras OTUs, identificadas somente em níveis superiores (ordem, classe, filo) foram também consideradas, por terem abundância acima de 3%.

Observou-se que a diversidade de grupos taxonômicos dominantes entre os FBP foi completamente diferente (Figura 6.26). Embora os valores de índices de Shannon tenham sido parecidos entre as amostras do topo do FBP de espuma (1,05m) e do topo (1,05 m) e fundo (4,20 m) do FBP de placas (em torno de 4,0), a estrutura da comunidade bacteriana considerando as OTUs predominantes foi completamente diferente.

A maioria dos grupos bacterianos presentes nos FBP é heterotrófica (Apêndice G; Tabela 0.6). É importante ressaltar que mesmo em sistemas autotróficos (como reatores anammox alimentados com meio de cultura sem fonte de carbono) e reator nitrificante, a comunidade predominante é de heterotróficos conforme observado, respectivamente, por Costa *et al.*, (2014) e Ye *et al.* (2011). Os grupos que predominaram no fundo do FBP de espuma provavelmente seriam adaptados a menores concentrações de matéria orgânica que aqueles predominantes no topo do FBP, uma vez que o perfil de matéria orgânica (em termos de DQO) diminuiu ao longo da profundidade do FBP.

Figura 6.26 – Comparação dos grupos taxonômicos predominantes (acima de 3% em pelo menos uma amostra) no topo (1,05 m) e no fundo (4,20 m) de ambos os FBP em P1



Baseado na caracterização físico-química de ambos os FBPs, a pouca diferenciação de condições ambientais ao longo do FBP de placa refletiu na sua comunidade bacteriana, que foi semelhante entre topo e fundo. Além disso, os grupos taxonômicos predominantes foram completamente diferentes daqueles desenvolvidos no FBP de espuma. As diferentes condições de disponibilidade de substratos (relações A/M; Tabela 6.3) e de retenção de micro-organismos levaram, então, ao desenvolvimento de uma comunidade bacteriana específica para cada FBP. As relações A/M no FBP de espuma foram bem menores que no FBP de placas, sugerindo que os micro-organismos que se desenvolveram no primeiro FBP eram adaptados a condições oligotróficas.

Poucos grupos microbianos dominantes eram comuns entre os FBPs (por exemplo, família *Verrucomicrobiaceae*). As condições ambientais impostas ao FBP de espuma selecionaram, de uma forma geral, populações oligotróficas neste FBP. Dentre os grupos predominantes neste FBP (Figura 6.26), destacam-se as famílias *auto67_4W*, *Xanthomonadaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Acetobacteraceae* e *Gemmataceae*. Discussão mais aprofundada a respeito destas famílias será feita no item 6.6.1.3.

No FBP de placas, entretanto, as condições ambientais eram menos discrepantes entre topo e fundo. Praticamente, as mesmas populações bacterianas foram encontradas ao longo do FBP, porém com uma redução menos brusca nas abundâncias de alguns grupos heterotróficos ao longo do reator. Dentre os grupos predominantes no FBP de placa, destacam-se a classe *Clostridia* (famílias *Clostridiaceae* e *Peptostreptococcaceae*), membros do filo *Acidobacteria* (classe *Chloracidobacteria* e família *mb2424*), família *Caulobacteraceae*, família *Thiotrichaceae*, ordem *Rickettsiales* e família *Nitrosomonadaceae*.

A classe *Clostridia* é conhecida por incluir anaeróbios e fermentadores clássicos, de crescimento rápido ou r-estrategistas (NOLL *et al.*, 2005; YAMADA & SEKIGUCHI, 2009). A família *Clostridiaceae* foi representada principalmente pelo gênero *Fusibacter* (2 a 10% de todas as sequências analisadas). Embora haja pouco conhecimento sobre *Fusibacter* e considerando as condições ambientais predominantes no FBP de placa (por exemplo, baixo TRS, alta relação A/M) é plausível que o gênero tenha um comportamento fisiológico semelhante aos outros *Clostridia*, sendo provavelmente r-estrategistas. Outro *Clostridia* predominante no FBP de placas foi a família *Peptostreptococcaceae*, com abundâncias de 3,3 a 4,2% (topo e fundo, respectivamente). No FBP de espuma, as maiores abundâncias foram

nos compartimentos superiores (2,5 a 2,9%), diminuindo consideravelmente do topo para o fundo.

A família *mb2424* e a classe *Chloracidobacteria* pertencem ao filo *Acidobacteria*, cujas sequências são ubíquas no ambiente e intensamente detectadas em solos. Entretanto, o conhecimento fisiológico do filo ainda é escasso. *Chloracidobacteria* é um fotoheterotrófico com pouca versatilidade metabólica. Estudos indicam que essas acidobactérias crescem sintroficamente com outros micro-organismos (Apêndice G; Tabela 0.6).

A ordem *Rickettsiales* é constituída por bactérias parasitas obrigatórias de artrópodes, cujas sequências foram encontradas em abundância especialmente no topo (3,5%), provavelmente em virtude de maiores quantidades de artrópodes (larvas de insetos) no FBP de placa. Membros da família *Caulobacteraceae* foram muito encontrados no topo e no fundo do FBP de placas, porém com pouca abundância FBP de espuma (0,7 -2,6% de abundância relativa). A família estava representada principalmente pelo gênero *Phenylobacterium*, que é um aeróbio obrigatório, especialista em degradar compostos xenobióticos (Apêndice G; Tabela 0.6). As menores abundâncias deste gênero no FBP de espuma podem ter sido em virtude da competição com outros heterotróficos mais bem-sucedidos neste FBP.

Ainda de acordo com a Figura 6.26, observa-se que as populações de oxidadores de sulfeto também foram diferentes entre os FBPs em P1. No FBP de placas, predominaram as famílias *Rhodobacteraceae* e *Thiotrichaceae*, enquanto que no FBP de espuma, *Acetobacteraceae*. Com exceção de *Thiotrichaceae*, que é aeróbio e oxidador de enxofre obrigatório, as outras famílias são membros das ordens *Rhodobacterales* e *Rhodospirillales*, conhecidas por incluir bactérias púrpuras não sulfurosas e oxidadoras de enxofre facultativas, desnitrificantes, podendo realizar fotossíntese anoxigênica (fixação de CO₂ na presença de H₂S como doador de elétrons). Estas bactérias apresentam metabolismo extremamente versátil, porém têm crescimento preferencialmente fotoheterotrófico (Apêndice G; Tabela 0.6).

Em termos relativos, a família *Nitrosomonadaceae* foi mais detectada no fundo do FBP de placa. As abundâncias desta família no FBP de espuma estiveram entre 0,6-2,0%. A maior abundância de *Nitrosomonadaceae* no fundo do FBP de placa pode ter sido em virtude da diminuição das concentrações de sulfeto ao longo do FBP (discussão no item 6.3.2). Com relação ao FBP de espuma, o aumento de nichos anóxicos e a presença de bactérias anammox

(estas praticamente ausentes no FBP de placa) são fatores que podem ter influenciado no desenvolvimento de *Nitrosomonadaceae*, conforme discutido no item 6.7.1.1.

6.5.3 Conclusões do item 6.5

As condições ambientais proporcionadas pelos dois tipos de meio-suporte levaram ao desenvolvimento diferenciado de comunidades microbianas, conforme mostrado pelas análises de pirosequenciamento, confirmando assim a hipótese 1. Embora o filo predominante em ambos os FBPs foi *Proteobacteria*, observou-se que a comunidade bacteriana desenvolvida em cada FBP foi completamente diferente. No FBP de espuma, outros filios predominantes foram *Verrucomicrobia* e *Planctomycetes*, conhecidos na literatura por incluir, respectivamente, bactérias oligotróficas de lento crescimento e bactérias com estrutura celular complexa, características de organismos K-estrategistas. No FBP de placa, além de *Proteobacteria*, observou-se o predomínio de *Firmicutes* e *Acidobacteria. Clostridia*, membro mais abundante de *Firmicutes*, é conhecido por incluir bactérias generalistas de crescimento rápido, o que caracteriza organismos r-estrategistas.

Estas informações estão coerentes com as relações A/M encontradas para cada reator, que mostraram que as condições nutricionais eram mais escassas no FBP de espuma, em virtude do maior acúmulo de biomassa nos compartimentos desse reator. O maior TRS do meio-suporte de espuma favoreceu a retenção de micro-organismos e maior tempo de contato destes com os substratos, fundamentais para o desenvolvimento de micro-organismos de crescimento mais lento. Por outro lado, as condições de rápida passagem de substratos, em virtude do fluxo hídrico e da menor retenção de substratos no FBP de placa, privilegiaram o desenvolvimento de micro-organismos de crescimento mais rápido e adaptados a concentrações maiores de substratos quando comparados àqueles presentes no FBP de espuma. Não obstante, observou-se também a presença de micro-organismos especialistas em explorar determinados recursos (por exemplo, *Phenylobacterium*, *Thiotrix* e *Thiobacillus*), que apresentariam vantagens competitivas em relação aos outros generalistas.

Quanto às bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio, observou-se a presença de AOB e anammox no FBP de espuma, enquanto que no de placa, somente AOB foi detectada. A presença de anammox no FBP de espuma indica que tais bactérias podem ter papel importante na remoção de nitrogênio em FBP pós-reator UASB, mostrando que outra via metabólica, além da oxidação por AOB, está envolvida na remoção de $N-NH_4^+$. Esta conclusão confirma a

hipótese 2, que afirma que o FBP de espuma é mais eficiente em reter maior quantidade de micro-organismos de crescimento lento envolvidos na oxidação da amônia; e a hipótese 3, que afirma que o meio-suporte de espuma ofereceria condições aeróbias e anaeróbias para o desenvolvimento simultâneo de bactérias nitrificantes, desnitrificantes e anammox.

Bactérias desnitrificantes concentraram-se nos compartimentos superiores, diminuindo conforme a redução das concentrações de matéria orgânica. *Roseomonas* and *Bradyrhizobium* foram os gêneros de desnitrificantes mais abundantes no FBP de espuma. *Roseomonas* foi primeiramente descrito em amostras clínicas de bacteremia, contudo, nos últimos anos, tem sido detectado em vários ambientes. *Bradyrhizobium* compreende bactérias simbióticas de plantas leguminosas e sua dominância pode estar relacionada às condições ambientais promovidas pelo meio-suporte de espuma, que simularia àquelas encontradas em solo, uma vez que o gênero praticamente não foi detectado no FBP preenchido por placa. Neste FBP, a comunidade de desnitrificantes era mais diversa, porém menos abundante que no de espuma.

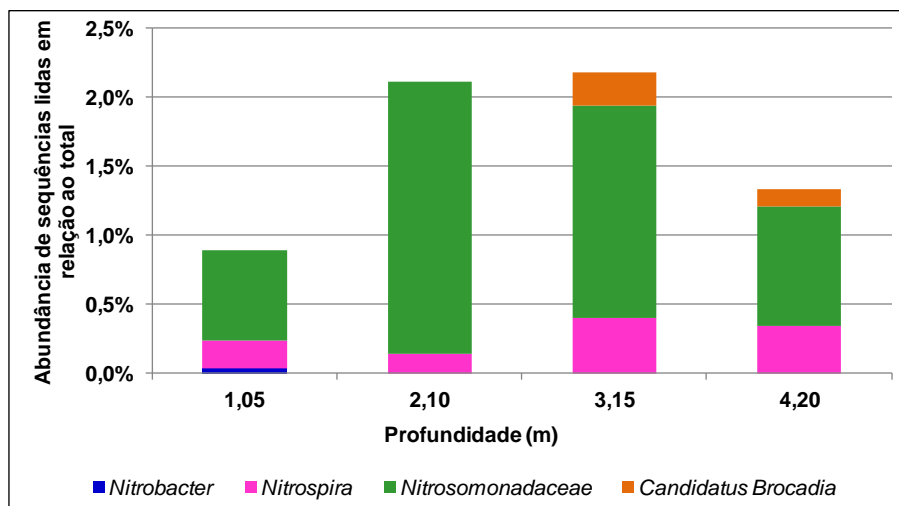
6.6 Influência nas concentrações de substratos na estrutura da comunidade bacteriana ao longo da profundidade do FBP de espuma

6.6.1 Caracterização da comunidade de bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio

6.6.1.1 Caracterização de AOB, NOB e anammox

Em P1, as abundâncias de nitrificantes e anammox variaram entre 0,9 a 2,2% (Figura 6.27). Maiores abundâncias de AOB foram vistas no segundo e terceiro compartimentos do FBP de espuma, coerentes com os resultados de Kubota *et al.* (2014), que analisaram a comunidade microbiana de um reator preenchido com meio-suporte DHS, tratando efluente de reator UASB. Eles observaram que as proporções de AOB variaram ao longo da profundidade do reator, com maiores abundâncias no meio e nas porções inferiores do que no topo. Com relação a *Nitrospira*, estas foram mais detectadas nos compartimentos inferiores, enquanto que bactérias anammox foram detectadas apenas no terceiro e quarto compartimentos.

Figura 6.27 – Composição da comunidade de AOB, NOB e anammox ao longo da profundidade do FBP de espuma em P1, conforme resultados do pirosequenciamento.



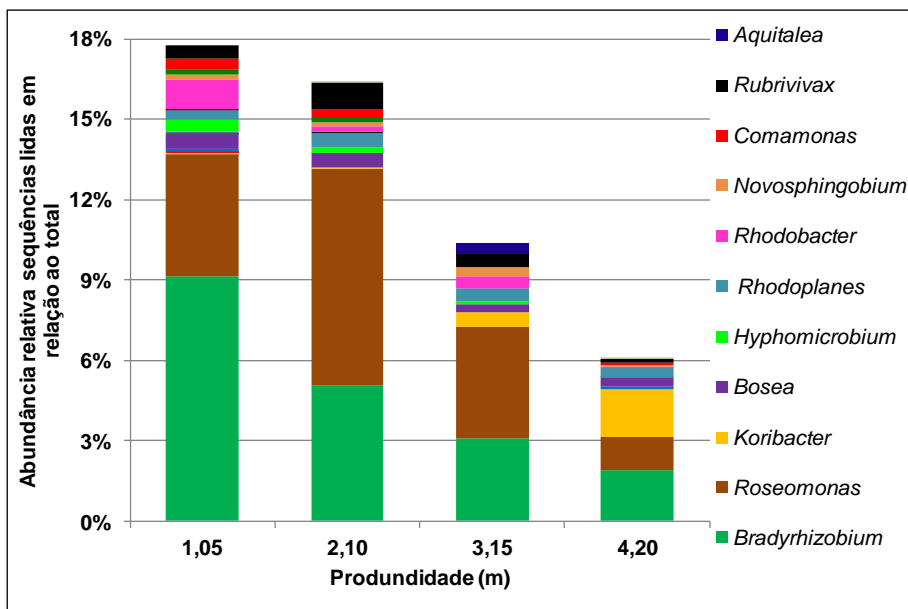
6.6.1.2 Caracterização da comunidade de bactérias desnitrificantes

A caracterização da comunidade de desnitrificantes ao longo do FBP de espuma em P1 (Figura 6.28) mostrou que gêneros *Bradyrhizobium* e *Roseomonas* predominaram não somente no topo e no fundo do FBP, como também nos outros compartimentos. Como discutido anteriormente, a predominância destes gêneros no FBP de espuma provavelmente foi devido ao seu maior TRS, que permite retenção de substratos e mais tempo para o desenvolvimento de micro-organismos de lento crescimento. Por exemplo, no caso de *Bradyrhizobium*, informações na literatura relatam que o gênero é constituído por bactérias estritamente quimiorganotróficas, oligotróficas e de crescimento relativamente lento (tempo de duplicação celular > 8 h; BRENNER *et al.*, 2005b). As baixas abundâncias do gênero no FBP de placa indicam que tais bactérias não conseguiam se desenvolver neste tipo de meio-suporte, que seria mais favorável ao desenvolvimento de micro-organismos de crescimento mais rápido e/ou adaptados a condições menos oligotróficas.

Um gênero de bactéria desnitrificante que, ao contrário dos anteriores, aumentou ao longo da profundidade do FBP de espuma (Figura 6.28), foi *Candidatus Koribacter*, pertencente ao filo *Acidobacteria*. Embora membros do filo *Acidobacteria* tenham sido abundantes no FBP de placa (conforme discutido no item 6.5.2.3), este gênero não foi detectado no mesmo. Até o momento, há poucas informações fisiológicas a respeito de *Koribacter*. Traços de cultivo e estudos genômicos indicam que é um micro-organismo heterotrófico versátil, que utiliza açúcares simples a substratos mais complexos (hemicelulose, celulose e quitina) como fontes

de carbono, adaptado a baixas condições nutricionais e com capacidade de redução de nitrato a nitrito (WARD *et al.*, 2009).

Figura 6.28 – Composição da comunidade de bactérias desnitrificantes ao longo da profundidade do FBP de espuma em P1, conforme resultados do pirosequenciamento

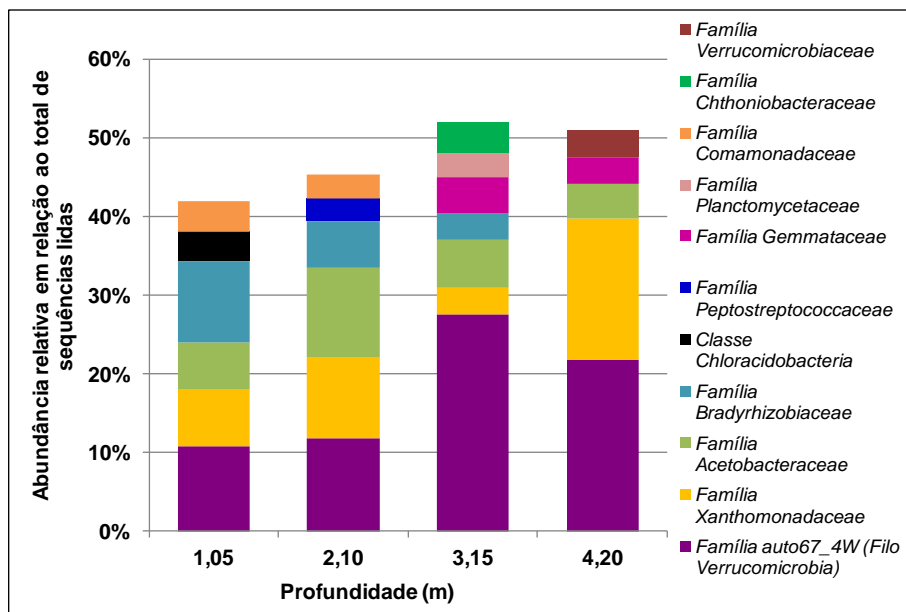


6.6.1.3 Caracterização da comunidade com base nos grupos taxonômicos predominantes

Ao se analisar a comunidade de grupos taxonômicos predominantes nos quatro compartimentos do FBP (Figura 6.29), verificou-se que alguns grupos diminuíram ao longo da profundidade do FBP, enquanto que outros aumentaram. O único grupo taxonômico que ficou mais uniformemente distribuído entre topo e fundo do FBP foi a família *Acetobacteraceae*, representada principalmente pelo gênero *Roseomonas*, cuja discussão já foi feita no item 6.5.2.2.

A classe *Chloracidobacteria* e as famílias *Comamonadaceae*, *Peptostreptococcaceae* e *Bradyrhizobiaceae* reduziram-se do topo para o fundo do FBP de espuma. Tais grupos são constituídos por bactérias quimiorganotróficas e sua redução estaria vinculada à redução das concentrações de matéria orgânica ao longo da profundidade do reator. No caso de *Chloracidobacteria*, a presença restrita ao topo do FBP está também relacionada com a presença de luz, uma vez que a classe é constituída por bactérias fotoheterotróficas.

Figura 6.29 – Grupos taxonômicos predominantes (acima de 3% em pelo menos uma amostra) ao longo das profundidades do FBP de espuma em P1



Dentre os grupos que predominaram ao longo da profundidade do FBP, destacam-se aqueles relacionados ao filo *Verrucomicrobia* (famílias *auto67_4W*, *Verrucomicrobiaceae*, *Chthoniobacteraceae*). Dentre estes, a família *auto67_4W*, pertencente à ordem *Pedosphaerales*, foi o grupo taxonômico mais abundante em todos os compartimentos do FBP de espuma em P1, principalmente no fundo.

Na literatura, as informações fisiológicas sobre o filo *Verrucomicrobia* são escassas, embora clones de genes de RNAr 16S desses micro-organismos vêm sendo recuperados de uma ampla variedade de ambientes. Alguns estudos indicam que essas bactérias sejam oligotróficas. Noll *et al.* (2005) observaram a predominância de verrucomicróbios na zona óxica de um microcosmo de solo inundado em estágio quase estável, sendo considerados como micro-organismos K-estrategistas. Portanto, de acordo com as informações obtidas na literatura até o momento sobre o filo *Verrucomicrobia* e sobre a ordem *Pedosphaerales* (Apêndice G; Tabela 0.6), supõe-se que os verrucomicróbios sejam bactérias heterotróficas, aeróbias, de lento crescimento, adaptadas a condições oligotróficas, o que condiz com as condições ambientais presentes no FBP de espuma.

Outras bactérias quimiorganotróficas, incluídas no filo *Planctomycetes* (famílias *Planctomycetaceae* e *Gemmataceae*) e na família *Xanthomonadaceae* tiveram um comportamento semelhante ao dos verrucomicróbios, aumentando também do topo para o

fundo do FBP. Portanto, as informações microbiológicas, aliadas com aquelas obtidas pelos resultados físico-químicos, indicam que os níveis de oligotrofia devem variar entre os microrganismos presentes no FBP de espuma em virtude da diversificação das condições ambientais entre topo e fundo. Assim, as condições ambientais existentes nos compartimentos inferiores selecionaram populações microbianas ainda mais oligotróficas que aquelas presentes nos compartimentos superiores do FBP.

6.6.2 Conclusões do item 6.6

A composição de comunidade bacteriana envolvida no ciclo do nitrogênio variou ao longo da profundidade do FBP de espuma em P1, confirmando também a hipótese 4. Sequências de bactérias anammox foram detectadas no fundo do FBP, enquanto AOB foram mais abundantes nos compartimentos intermediários (coerentes com alguns resultados na literatura). NOB foram representadas por sequências de *Nitrospira*, encontradas em baixa abundância, principalmente nos compartimentos inferiores. Como observado no item 6.5.2.2, as bactérias desnitrificantes diminuíram ao longo da profundidade de acordo com a redução das concentrações de matéria orgânica e, no geral, a comunidade foi dominada pelos gêneros *Bradyrhizobium* e *Roseomonas*. Os resultados comprovaram que anammox, nitrificantes e desnitrificantes coexistiam nos compartimentos, confirmando mais uma vez a hipótese 3. Isso significa que diferentes vias metabólicas estavam envolvidas na remoção de compostos nitrogenados no reator.

A detecção de grupos microbianos estritamente anaeróbios por pirosequenciamento (tais como *Synergistetes*, *Peptostreptococcaceae* e *Fusibacter*), confirma a existência também de nichos anóxicos no FBP de placa. Anammox, entretanto, não foi detectada, o que sugere outros fatores inibiram o desenvolvimento desta bactéria (por exemplo, o baixo TRS do meio-suporte).

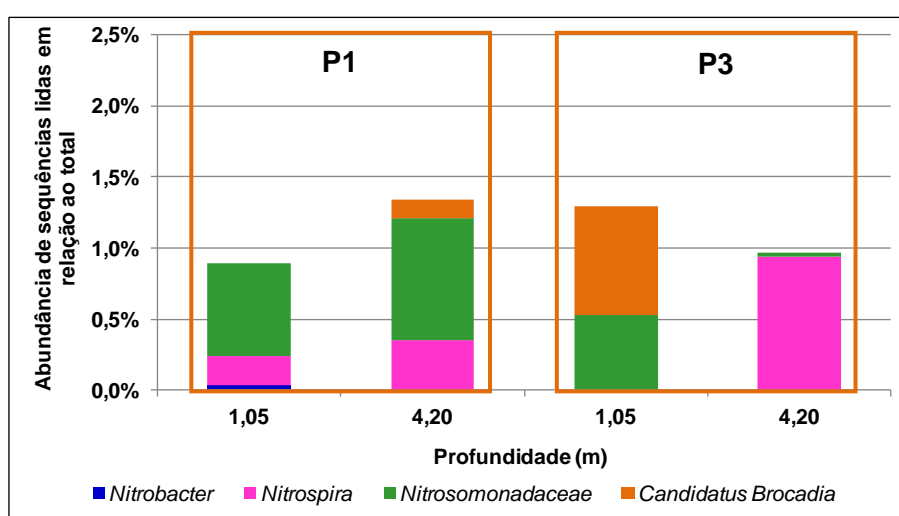
A estratificação de substratos propiciada pelo alto TRS e TDH do meio-suporte de espuma, provocou uma seleção ecológica de diferentes grupos bacterianos. A redução de algumas populações ao longo do FBP de espuma (por exemplo, *Bradyrhizobiaceae*) e o aumento de outras (membros de *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* e *Xanthomonadaceae*) sugerem que os níveis de oligotrofia eram diferentes entre essas populações, de tal forma que as condições ambientais existentes nos compartimentos inferiores selecionaram populações microbianas ainda mais oligotróficas que aquelas presentes nos compartimentos superiores do FBP.

6.7 Avaliação da influência das concentrações de substratos na estrutura da comunidade ao longo do tempo no FBP de espuma

6.7.1 Caracterização da comunidade de AOB, NOB e anammox

Comparando-se a comunidade de nitrificantes e anammox desenvolvida no topo e no fundo do FBP de espuma em P1 e P3 (Figura 6.30), observa-se que as abundâncias de anammox aumentaram no topo do FBP. Isso indica que ambos os processos de oxidação de amônia ocorriam simultaneamente nesse compartimento.

Figura 6.30 – Composição da comunidade de AOB, NOB e anammox encontrada no topo e no fundo do FBP de espuma em P1 e P3, conforme resultados do pirosequenciamento.



Três fatores podem ter favorecido o enriquecimento de anammox em relação a AOB no sistema: primeiro, o tempo operacional e o TRS, uma vez que o FBP já tinha quase um ano de operação em P3, com TRS observado dentro das espumas em torno de 90-130 dias (ALMEIDA, 2012). Segundo fator seria a maior afinidade por $\text{NH}_4^+\text{-N}$ pelas bactérias anammox em relação a AOB. Terceiro, o aumento de nichos anóxicos dentro das espumas em virtude do crescimento microbiano e consumo de oxigênio nas porções externas.

A redução significativa de N-NH_4^+ nos afluentes em P3 favoreceria o desenvolvimento de anammox, uma vez que estas têm maior afinidade por íon amônio que as AOB. Analisando-se as taxas de afinidade pelo substrato (K_s), observa-se que os valores de K_s para anammox são muito baixos (menores que $5\mu\text{M}$ para íon amônio e nitrito; KRIEG *et al.*, 2010), 4 a 10 vezes menores que a maioria das AOB (BRENNER *et al.*, 2005b). Entretanto, linhagens de *Nitrosomonas oligotropha* e *N. urea* também apresentam valores de $K_{s\text{NH}_4^+}$ menores que $5\mu\text{M}$

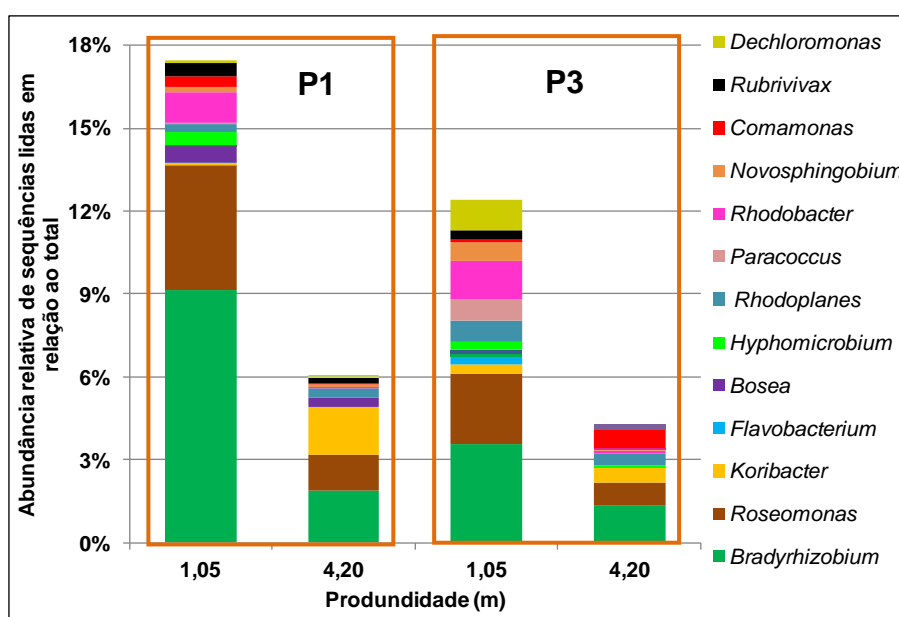
(respectivamente 3,6 e 2,4 μM ; BRENNER *et al.*, 2005b). Destaca-se que linhagens relacionadas a *N. oligotropha* foram detectadas, por DGGE, principalmente nos compartimentos inferiores do FBP de espuma (mostrado no item 6.4). Então, um terceiro fator estaria influenciando na competição entre anammox e AOB, que é o aumento de nichos anóxicos no meio-suporte. Isso inibiria o crescimento de AOB, uma vez que estas são, em sua maioria, aeróbias obrigatórias, enquanto que anammox são anaeróbias estritas.

Ainda de acordo com a Figura 6.29, observou-se que as populações de AOB e anammox reduziram-se no fundo do FBP em P3 provavelmente em virtude das reduzidas concentrações de N-NH_4^+ e CaCO_3 , que são substratos fundamentais para o desenvolvimento dessas bactérias. A redução de anammox neste compartimento pode ter influenciado no aumento de *Nitrospira*, uma vez que ambos os grupos competem por N-NO_2^- .

6.7.2 Caracterização da comunidade de desnitrificantes

A comunidade de desnitrificantes sofreu bruscas alterações em P3, principalmente no topo do FBP (Figura 6.31). Uma vez que a maioria das desnitrificantes detectadas é heterotrófica (Apêndice G; Tabela 0.6), a redução dessas bactérias foi atribuída à redução significativa das cargas orgânicas ocorridas durante este período.

Figura 6.31 – Composição da comunidade de bactérias desnitrificantes encontradas no topo e no fundo do FBP de espuma em P1 e P3



Embora as abundâncias relativas de desnitrificantes tenham diminuído, a diversidade de gêneros aumentou, particularmente no topo, em função da redução dos gêneros ora predominantes em P1: *Bradyrhizobium*, *Roseomonas* e *Koribacter* (este último no fundo do FBP). Um dos gêneros que se desenvolveram, *Dechloromonas*, é um micro-organismo anaeróbio facultativo, especialista, envolvido na redução de clorato e perclorato a cloreto (BRENNER *et al.*, 2005b).

Sequências de *Rhodobacter* foram mais detectadas no topo do FBP. O gênero pertence à família *Rhodobacteraceae*, constituído por bactérias púrpuras não sulfurosas, fotoheterotróficas (Apêndice G; Tabela 0.6), encontrada em maior abundância no FBP de placa (Figura 6.26). Isso sugere que membros desta família também estejam adaptados a condições ambientais com maiores concentrações orgânicas.

6.7.3 Outros grupos taxonômicos abundantes

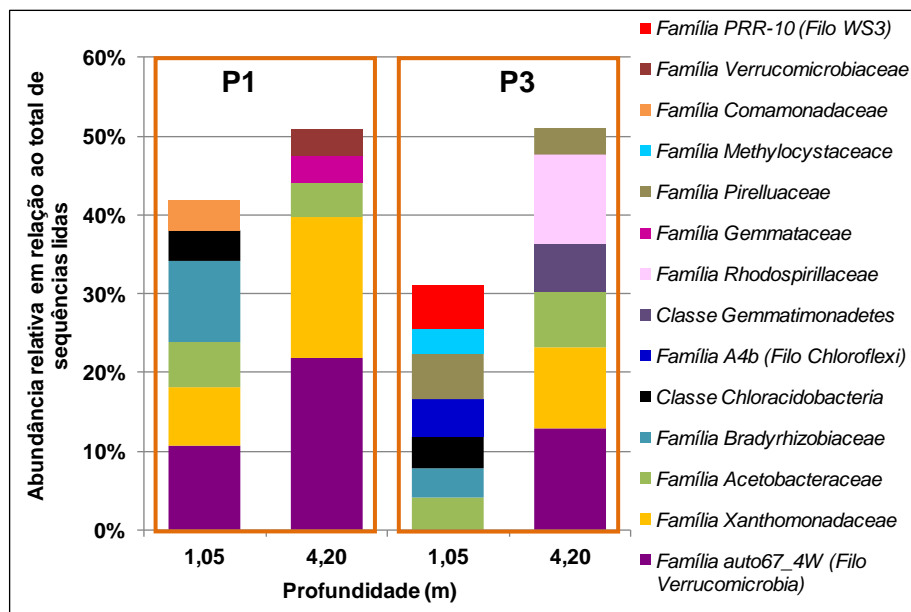
No que diz respeito a grupos predominantes no FBP em P1 e P3 (Figura 6.32), destacam-se as alterações ocorridas na comunidade, principalmente no topo. Primeiro, observou-se a redução das famílias *Xanthomonadaceae* e *Bradyrhizobiaceae*, predominantes em P1, tanto no topo quanto no fundo, provavelmente em virtude da redução significativa das cargas orgânicas em P3. A redução dessas populações pode ter levado a diminuição na competição por espaço e substratos (por exemplo, oxigênio) no meio-suporte de espuma, permitindo o aumento relativo de outras bactérias menos abundantes em P1.

Dentre as bactérias que aumentaram no topo do FBP, destacam-se membros das famílias *Methylocystaceae*, *Pirellulaceae* e de grupos desconhecidos: filo candidato WS3 e a família candidata A4b, (classe *Anaerolineae*, filo *Chloroflexi*). A família *Methylocystaceae* é constituída por bactérias metanotróficas aeróbias que estariam degradando o metano dissolvido presente no efluente do reator UASB. Kubota *et al.* (2014) também encontraram essas bactérias no topo de um reator de espuma tratando efluente de reator UASB.

A classe *Anaerolineae* é constituída por bactérias filamentosas, quimiorganotróficas, anaeróbias estritas. Alguns estudos sugerem que elas crescem somente em sintrofia com outros micro-organismos e que podem degradar material de origem (Apêndice G; Tabela 0.6). Quanto ao filo WS3, informações na literatura são muito escassas. Entretanto, estudos

sugerem que membros deste filo coexistem com bactérias do filo *Chloroflexi* em ambientes anaeróbios ou anóxicos (SCHNEIDER *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014).

Figura 6.32 – Comparação dos grupos taxonômicos predominantes (acima de 3% em pelo menos uma amostra) no topo (1,05 m) e no fundo (4,20 m) do FBP de espuma em P1 e P3, conforme resultados do pirosequenciamento.



A abundância de grupos dominantes também foi maior no fundo em relação ao topo em P3. Isso significa que apenas alguns grupos conseguiram se desenvolver nas condições ambientais existentes no fundo do reator, que, em termos de substratos, eram bem mais escassas que no topo. Entretanto, alguns grupos (famílias *auto67_4W*, *Acetobacteraceae* e *Xanthomonadaceae*) poderiam ser considerados micro-organismos residentes, uma vez que foram encontrados em todos os compartimentos (exceto no topo do FBP em P3) nos períodos analisados.

Como ocorrido em P1, micro-organismos do filo *Planctomycetes* foram intensamente detectados nos compartimentos inferiores do FBP de espuma (famílias *Gemmataceae* e *Pirellulaceae*). Há poucas informações fisiológicas sobre estas famílias, sabendo-se até o momento que são bactérias aeróbias (algumas anaeróbias facultativas), comumente encontradas no ambiente (Apêndice G; Tabela 0.6). No geral, a morfologia celular é complexa, com estruturas membranosas intracelulares ou estruturas de fixação ao substrato, podendo formar aglomerações de várias células.

Além de *Planctomycetes*, membros da família *Rhodospirillaceae* e do filo *Gemmatimonadetes* foram detectados em abundância no fundo do FBP em P3, indicando que tais bactérias também sejam adaptadas a condições extremamente oligotróficas, o que está coerente com alguns estudos encontrados na literatura (Apêndice G; Tabela 0.6).

6.7.4 Comparação dos resultados de abundâncias relativas de bactérias do ciclo do nitrogênio obtidos por PCR em tempo real e por pirosequenciamento 454

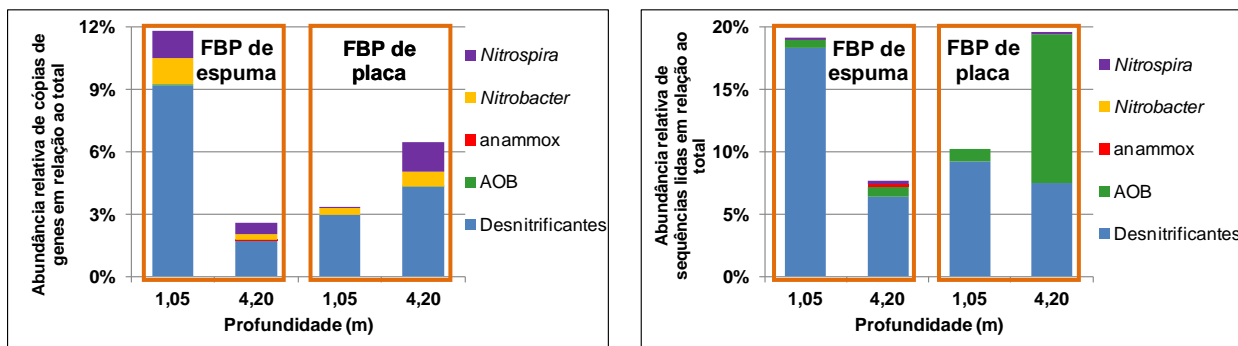
Algumas diferenças foram observadas entre os resultados de PCR em tempo real e do pirosequenciamento 454 (Figuras 6.33, 6.34 e 6.35). Por exemplo, as estimativas de abundâncias relativas de AOB, detectadas por pirosequenciamento, foram muito maiores que aquelas estimadas por PCR em tempo real. Tais diferenças ocorreram porque o par de iniciadores utilizado na PCR em tempo real tinha como gene-alvo aquele que codifica a enzima amoniamonooxigenase (gene *amoA*), enquanto que, no pirosequenciamento, o gene-alvo era o de RNAr 16S. Geets *et al.* (2007) também encontraram maiores valores AOB e de outros grupos quanto estimadas pelos iniciadores de genes de RNAr 16S. Segundo os autores, os resultados podem ser divergentes porque o número de genes de RNAr 16S por bactéria é variável (de 1 a 13), enquanto que o número de genes funcionais, tais como o gene *amoA*, é menor, variando de 1 a 3 cópias.

As abundâncias relativas de bactérias desnitrificantes também foram maiores no pirosequenciamento, pois foram selecionados gêneros de bactérias reconhecidamente desnitrificantes, porém que podem realizar a redução completa ou parcial de nitrato ou nitrito. No caso do PCR em tempo real, o gene-alvo foi um gene funcional, que codifica a enzima óxido nitroso redutase (gene *nosZ*), presente apenas em bactérias que realizam redução completa de nitrato ou nitrito a N₂. Não obstante, ambas as técnicas mostraram que as desnitrificantes constituíam o grupo principal dentro do ciclo do nitrogênio. Além disso, a porcentagem relativa de desnitrificantes no topo do FBP de placa foi menor que no FBP de espuma em P1 (Figura 6.33). Entretanto, entre topo e fundo do FBP de placa, os resultados das duas técnicas são discordantes, o que poderia sugerir que as abundâncias de desnitrificantes não sejam muito diferentes ao longo deste FBP.

Com relação à comunidade de AOB ao longo da profundidade, as abundâncias relativas foram muito diferentes no FBP de placa, indicando inclusive que a população de AOB constituía quase 12% da comunidade total em P1 (resultados do pirosequenciamento, Figura 6.35).

Entretanto, ambas as técnicas mostraram ausência ou presença insignificante de genes de anammox no topo e no fundo do FBP de placa.

Figura 6.33 – Comparação das abundâncias relativas de bactérias do ciclo do nitrogênio estimadas, por PCR em tempo real e pirosequenciamento, em ambos os FBPs em P1



(A) PCR em tempo real

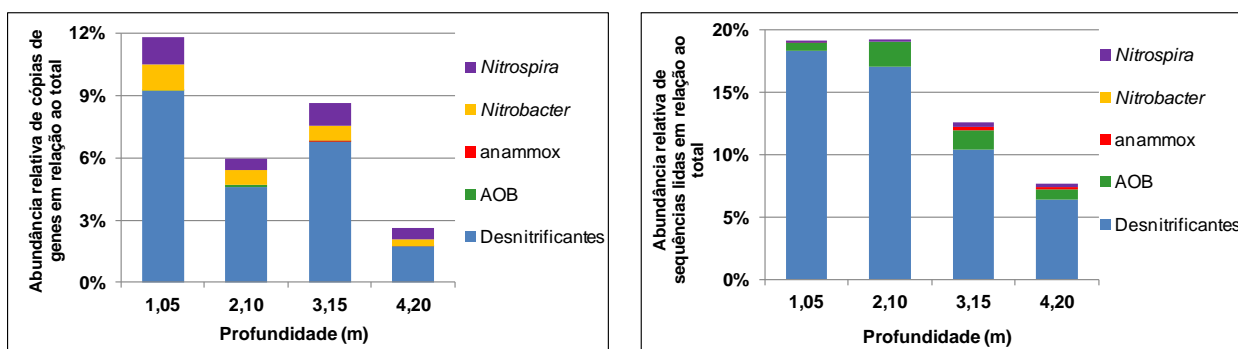
Abundâncias relativas de genes específicos quantificados em relação ao total de genes de RNAr 16S de bactérias em geral (iniciadores 1055F/1392R)

(B) Pirosequenciamento

Abundâncias relativas de seqüências lidas de genes de RNAr 16S, identificadas em nível de gênero ou família e específicas do ciclo do nitrogênio, em relação ao total.

Com relação ao FBP de espuma, ambas as técnicas mostraram um decaimento de desnitrificantes ao longo da profundidade do reator em P1 (Figuras 6.33 e 6.34). Além disso, ambas as técnicas mostraram menores porcentagens de AOB no topo e no fundo do FBP de espuma em relação aos compartimentos intermediários, assim como maiores porcentagens de anammox na profundidade 3,15m em P1 (Figura 6.34).

Figura 6.34 – Comparação das abundâncias relativas de bactérias do ciclo do nitrogênio estimadas, por PCR em tempo real e pirosequenciamento, ao longo do FBP de espuma em P1



(A) PCR em tempo real

Abundâncias relativas de genes específicos quantificados em relação ao total de genes de RNAr 16S de bactérias em geral (iniciadores 1055F/1392R)

(B) Pirosequenciamento

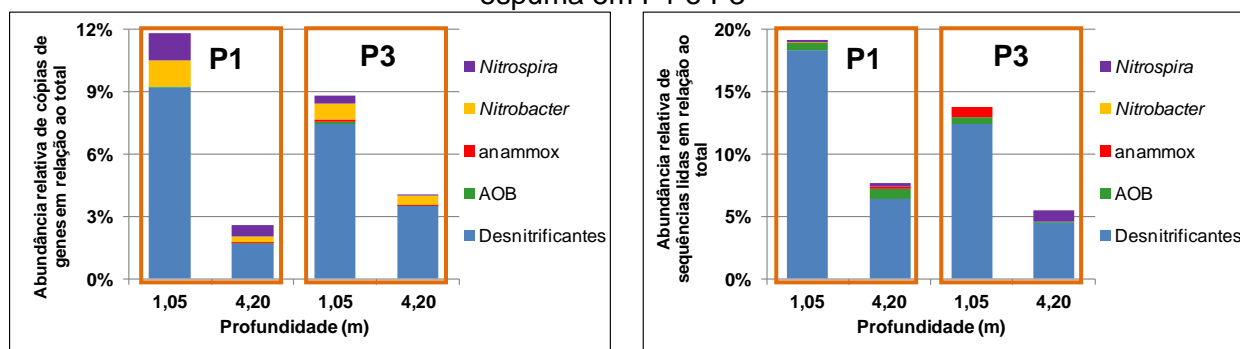
Abundâncias relativas de seqüências lidas de genes de RNAr 16S, identificadas em nível de gênero ou família, específicas do ciclo do nitrogênio, em relação ao total.

Com relação *Nitrospira*, o gênero foi mais intensamente detectado por PCR em tempo real. Não obstante, ambas as técnicas mostraram uma distribuição mais uniforme do gênero entre

os compartimentos do FBP de espuma. Entretanto, no FBP de placa, ocorreu aumento dessas bactérias do topo para o fundo deste reator.

Na Figura 6.35, observa-se que ambas as técnicas detectaram algumas cópias de genes de anammox no fundo do FBP de espuma em P1, com menor abundância (ou ausência) no topo do reator. Em P3, ocorreu o inverso: as duas técnicas indicaram aumento de anammox no topo do FBP, com pouca ou nenhuma detecção deste grupo e AOB fundo, provavelmente em virtude da escassez de íon amônio e alcalinidade. No caso de *Nitrospira*, os resultados em P3 foram discordantes entre as duas técnicas, sendo provável que o gênero tenha permanecido uniformemente distribuído ao longo do FBP de espuma.

Figura 6.35 – Comparação das abundâncias relativas de bactérias do ciclo do nitrogênio estimadas, por PCR em tempo real e pirosequenciamento, no topo e no fundo do FBP de espuma em P1 e P3



(A) PCR em tempo real
Abundâncias relativas de genes específicos quantificados em relação ao total de genes de RNAr 16S de bactérias em geral (iniciadores 1055F/1392R)

(B) Pirosequenciamento
Abundâncias relativas de sequências lidas de genes de RNAr 16S, identificadas em nível de gênero ou família, específicas do ciclo do nitrogênio, em relação ao total.

A baixa ou nenhuma detecção de *Nitrobacter* nas análises de pirosequenciamento pode ter sido em virtude da não identificação (até o nível de gênero) de sequências do pirosequenciamento relacionadas à ordem *Rhizobiales* (0,2 a 3,3% de abundância relativa) à família *Bradyrhizobiaceae* (0,1 a 5,5% de abundância relativa). Entretanto, tanto a ordem como a família são grupos extremamente heterogêneos, cujas sequências podem estar relacionadas a outros gêneros de fisiologia totalmente distinta da do gênero *Nitrobacter* (tais como *Bradyrhizobium*, *Bosea*, *Hyphomicrobium*, *Rhodoplanes*, etc.).

6.7.5 Conclusões do item 6.7

Os resultados analisados no item 6.7 também confirmaram a hipótese 4, uma vez que as estruturas das comunidades bacterianas eram diferentes entre topo e fundo no FBP de espuma em P3. A diminuição de populações de nitrificantes (AOB e NOB) neste período pode ter sido em virtude do aumento das populações de anammox, que competiriam com as nitrificantes por substratos (íon amônio, nitrito e alcalinidade). Esta conclusão nega a hipótese 5, que afirma que a redução da COV provocaria o aumento da comunidade nitrificante em detrimento do desenvolvimento de bactérias heterotróficas.

As variações da estrutura da comunidade bacteriana em geral, inclusive na comunidade de desnitrificantes, foram atribuídas à redução significativa nas concentrações orgânicas durante o P3, causando redução de populações ora predominantes e promovendo aumento na diversidade de bactérias ao longo do FBP, principalmente no topo do reator. Não obstante, observou-se que alguns grupos bacterianos permaneceram abundantes em determinados compartimentos ao longo do tempo (por exemplo, membros de *Chloracidobacteria* no topo e membros das famílias *auto67_4W*, *Acetobacteraceae* e *Xanthomonadaceae* no fundo do reator), significando que são micro-organismos residentes, ocupando nichos importantes dentro deste tipo de FBP.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados da presente tese permitiram concluir que as diferenças de constituição e configuração entre os meios-suportes de adesão estritamente superficial de biomassa (placas de polietileno) e de retenção intersticial (espumas de poliuretano) influenciaram principalmente na retenção de biomassa e de substratos dentro de cada reator, o que levou ao desenvolvimento de comunidades bacterianas diferentes tanto entre os FBPs, quanto ao longo de suas profundidades.

Uma vez que as comunidades bacterianas são selecionadas basicamente por suas estratégias de sobrevivência, as condições ambientais existentes em cada reator (TDH, TRS, disponibilidade de substratos por unidade de biomassa, concentrações de OD, etc.) permitiram o desenvolvimento de comunidades bacterianas diferentes entre os reatores. Por exemplo, observou-se a predominância de fermentadores de crescimento rápido (*Clostridia*) no FBP de placa, e de bactérias de oligotróficas de crescimento lento (*Verrucomicrobia*) e com estrutura celular complexa (*Planctomycetes*) no de espuma.

A distribuição de biomassa e de substratos entre topo e fundo foi mais diferenciada no FBP de espuma, uma vez que os altos valores de TDH (~ 2 horas) e TRS (~ 100 dias) permitiram o desenvolvimento massivo de micro-organismos, maximizando o consumo de substratos em cada compartimento. A redução da disponibilidade de substratos limitantes (por exemplo, matéria orgânica, N-amoniaco, alcalinidade carbonato) selecionava os micro-organismos a serem desenvolvidos no compartimento seguinte, de tal forma que a comunidade bacteriana presente no topo do FBP era muito diferente da que estava no fundo, o que não era muito evidente no FBP de placa. A coexistência de nitrificantes, anammox e desnitrificantes nos compartimentos do FBP de espuma significa que diferentes vias metabólicas estavam envolvidas na remoção de compostos nitrogenados.

Finalmente, o aprimoramento no sistema UASB-FBP foi alcançado com o uso espumas de poliuretano, devido ao fato deste tipo de meio-suporte promover maior retenção de micro-organismos e diversificação de condições ambientais no FBP, selecionando uma biomassa essencialmente constituída por micro-organismos de crescimento lento, porém mais eficiente na remoção de compostos orgânicos e nitrogenados.

8 RECOMENDAÇÕES

A partir dos resultados obtidos, recomenda-se a continuidade dos estudos nas seguintes linhas de investigação:

- Alguns estudos na literatura mostram que uma parcela significativa da biomassa contida no meio-suporte de espuma permanece inativa. A comparação de análises de DNA e RNA da comunidade seria importante para verificar quais os grupos que estariam ativos na comunidade, uma vez que a análise por DNA representa todos os micro-organismos, enquanto que a análise por RNA detecta apenas sequências de micro-organismos ativos. Outras técnicas de análise *in situ* da biomassa, tais como *live/dead* podem também ser utilizadas para avaliar (e quantificar) células microbianas viáveis.
- Embora não tenham sido detectadas neste trabalho, recomenda-se a continuidade da pesquisa de arqueias oxidadoras de amônia, utilizando-se outros pares de iniciadores. A análise da diversidade de arqueias por pirosequenciamento também seria interessante, uma vez que podem também ser encontradas arqueias metanogênicas e metanotróficas desnitrificantes, contribuindo para uma compreensão mais abrangente dos processos microbiológicos que ocorrem nestes FBPs.
- O alto potencial do FBP de espuma em reter micro-organismos e as abundâncias encontradas de micro-organismos oxidadores de sulfeto e de metano (obrigatórios e facultativos), além de outros que estocam substratos de reserva (polifosfatos, polihidroxibutirato), sugerem que o FBP tenha outras potencialidades, além da remoção de matéria orgânica e compostos nitrogenados. Para trabalhos futuros, propõe-se, então, a investigação exploratória da remoção biológica de enxofre, metano e fósforo em FBPs pós-reactor UASB preenchido por espuma de poliuretano.
- Uma grande parcela de micro-organismos ainda permanece desconhecida e investigações de pesquisa básica poderiam contribuir no conhecimento dos processos biológicos que ocorrem nos ecossistemas em geral, inclusive em sistemas de tratamento de efluentes e resíduos. Neste trabalho, por exemplo, cerca de 14 a 43% das sequências obtidas por pirosequenciamento, em cada uma das 8 amostras analisadas, foram relacionadas a grupos taxonômicos desconhecidos. Tais grupos foram identificados previamente por códigos, variando de filo a gênero, dos quais se têm pouca ou nenhuma informação

fisiológica. Alguns foram bem frequentes e, provavelmente, importantes no sistema de tratamento, como foi o caso da família *auto67_4W* do filo *Verrucomicrobia*. Isto mostra que estudos de isolamento e cultivo de micro-organismos e/ou análise de genomas completos seriam importantes para contribuir no conhecimento do papel ecológico desempenhado por esses micro-organismos no ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, Y. O. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochemistry*, 41:1709-1721, 2006.
- ALMEIDA, P. G. S.; CHERNICHARO, C.A.L.; SOUZA, C.L. Development of compact UASB/trickling filter systems for the treatment of domestic wastewater in small communities in Brazil. *Water Science and Technology*, v. 59, n. 7, p. 1431-1439, 2009.
- ALMEIDA, P. G. S. *Remoção de nitrogênio amoniacal e matéria orgânica em filtros biológicos percoladores aplicados ao pós-tratamento de efluentes de reatores UASB*. (Tese de Doutorado) Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. r and *K*-selection and microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology*, v. 9, p. 99-147, 1986.
- APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, 2012.
- AQUINO, S. F.; GLÓRIA, R. M.; SILVA, S. Q.; CHERNICHARO, C. A. L. Quantification of the inert chemical oxygen demand of raw wastewater and evaluation of soluble microbial product production in demo-scale upflow anaerobic sludge blanket reactors under different operational conditions. *Water Environmental Research*, v. 81, 2009.
- BACKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, v. 307, p. 1915–1920, 2005.
- BAI, Y.; SUN, Q.; WEN, D.; TANG, X. Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 80, p. 323-330, 2012.
- BASSIN, J. P.; KLEEREBEZEM, R.; MUYZER, G.; ROSADO, A. S.; LOOSDRECHT, M. C. M.; DEZOTTI, M. Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 1281-1294, 2012.
- BELSER, L. W. Population ecology of nitrifying bacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 33, p. 309-333, 1979.
- BODELIER, P. E.; LIBOCHANT, J. A.; BLOM, C. W. P. M.; LANBROEK, H. J. Dynamics of nitrification and denitrification in root oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low oxygen or anoxic habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 11, p.4100–4107, 1996.
- BOUGARD, D.; BERNET, N.; CHE'NEBY, D; DELGENE'S, J. P. Nitrification of a high-strength wastewater in an inverse turbulent bed reactor: effect of temperature on nitrite accumulation. *Process Biochemistry*, n. 41, p. 106–113, 2006.
- BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. Two. The Proteobacteria – Part B: Gammaproteobacteria*. Second edition, Springer, USA, 1102 p., 2005a.
- BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. Two. The Proteobacteria – Part C: The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria*. Second edition, Springer, Estados Unidos, 1388 p., 2005b.
- BRYANT, D. A.; COSTAS, A. M. G.; MARESCA, J. A.; CHEW, A. G. M.; KLATT, C. G.; BATESON, M. M.; TALLON, L. J.; HOSTELER, J.; NELSON, W. C.; HEIDELBERG, J. F.; WARD, D. M. *Candidatus* Chloracidobacterium thermophilum: an anaerobic phototrophic acidobacterium. *Science*, v. 317, p. 523-526, 2007.
- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, K.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; McDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTER, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME

- allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nature Methods*, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010a.
- CAPORASO, J. G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; DeSANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; KNIGHT, R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics*, v. 26, n. 2, p. 266-267, 2010b.
- CAMPOS, A. P. *Enriquecimento e caracterização de bactérias anammox para a remoção de nitrogênio amoniaco de efluentes*. (Dissertação de Mestrado) Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- CHEN, H.; LIU, S.; YANG, F. XUE, Y.; WANG, T. The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1548-1554, 2009.
- CHERNICHARO, C.A.L. (coordenador). *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios*. PROSAB/FINEP, 1ª ed. Rio de Janeiro: Segrac, 544 p., 2001.
- CLAESSON, M. J.; O'SULLIVAN, O.; WANG, Q.; NIKKILA, J.; MARCHESI, J.; SMIDT, H.; VOS, W. M.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *Plos One*, v. 4, n. 8, e6669, 2009.
- COSTA, M. C. M. S.; CARVALHO, L.; LEAL, C. D.; DIAS, M. F.; MARTINS, K. L., GARCIA, G. B.; MANCUELO, I. D.; HIPÓLITO, T.; MAC CONELL, E. F. A.; OKADA, D.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C. A.; ARAÚJO, J. C. Impacto f inocula and operating conditions on the microbial community structure of two anammox reactors. *Environmental Technology*, v. 35, p. 1-12, 2014.
- COSTAS, A. M. G.; LIU, Z.; TOMSHO, L. P.; SCHUSTER, S. C.; WARD, D. M.; BRYANT, D. A. Complete genome of *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*, a chlorophyll-based photoheterotroph belonging to the phylum *Acidobacteria*. *Environmental Microbiology*, v. 14, n. 1, p. 177-190, 2012.
- 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*, v. 67, n. 11, p. 5273-5284, 2001.
- DAIMS, H.; WAGNER, M. Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007.
- DANIEL, L. M. C. ; POZZI, E.; FORESTI, E.; CHINALIA, F. A. Removal of ammonium via simultaneous nitrification-denitrification nitrite-shortcut in a single packed-bed batch reactor. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1100-1107, 2009.
- DeBRUYN, J. M.; NIXON, L. T.; FAWAZ, M. N.; JOHNSON, A. M.; RADOSEVICH, M. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 17, p. 6295-6300, 2011.
- DEGRANGE, V. BARDIN, R. Detection and Counting of *Nitrobacter* Populations in Soil by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 6, p. 2093 – 2098, 1995.
- DIONISI, H. M., LAYTON, A. C., HARMS, G., GREGORY, I. R., ROBINSON, G. K., SAYLER, G. S. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha* – Like Ammonia – Oxidizing Bacteria and *Nitrospira* spp. from Full-Scale Wastewater Treatments Plants by Competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 245 – 253, 2002.
- ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, v. 308, p. 1635–1638, 2005.
- EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.
- EGLI K. LANGER C., SIEGRIST H., ZEHNDER A. J. B., WAGNER M., VAN DER MEER J. R. Community Analysis of Ammonia and Nitrite Oxidizers during Start-up of Nitritation Reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.3213 – 3222, 2003.

- ENWALL, K.; PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; SALIN, S. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8335 – 8343, 2005.
- FERRIS, M. J.; MUYZER, G.; WARDM, D. M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 2, p. 340 – 346, 1996.
- FIGUEROLA, E. L. M. & ERIJMAN, L. Diversity of nitrifying bacteria in a full-scale petroleum refinery wastewater treatment plant experiencing unstable nitrification. *Journal of Hazardous Materials*, v. 181, p. 281–288, 2010.
- FOTCH, D. D.; VERSTRAETE, W. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Advances in Microbial Ecology*, v. 1, p. 135-214, 1977.
- GEETS, J.; COOMAN, M.; WITTEBOLLE, L.; HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; VOS, P. VERSTRAETE, W.; BOON, N. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 211-221, 2007.
- GENTILE, M. E.; NYMAN, J. L., CRIDDLE, C. S. Correlation of patterns of denitrification instability in replicated bioreactor communities with shifts in the relative abundance and the denitrification patterns of specific populations. *International Society for Microbial Ecology*, v. 1, p. 714-728, 2007.
- GERARDI, M. H. *Wastewater bacteria*. Estados Unidos, 255 p., 2006.
- GIESEKE, A.; BJERRUM, L.; WAGNER, M.; AMANN, R. Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations coexisting in a biofilm. *Environmental Microbiology*, v. 5, n. 5, p. 355-369, 2003.
- GIESEKE, A.; PURKHOLD, U.; WAGNER, M.; AMANN, R.; SCHRAMM, A. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate removing biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 3, p. 1351-1362, 2001.
- GRAAF, A. A.; MULDER, A.; BRUJIN, P.; JETTEN, M. S. M.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.1246 – 1251, 1995.
- GRAHAM, D. W.; KNAPP, C. W.; VLECK, E. S. V.; BLOOR, K.; LANE, T. B.; GRAHAM, C. E. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *International Society for Microbial Ecology*, v. 1, P. 385-393, 2007.
- GUJER, W. Nitrification and me – A subjective review. *Water Research*, v. 44, n. 1, p. 1-19, 2010.
- HANAKI, K.; WANTAWIN, C.; OHGAKI, S. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.*, v. 24, n. 3, p. 289-296, 1990a.
- HANAKI, K.; WANTAWIN, C.; OHGAKI, S. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Water Research*, v. 24, n. 3, p. 297-302, 1990b.
- HARHANGI, H. R.; ROY, M. L.; ALEN, T.; HU, B. I.; GROEN, J. G.; KARTAL, B.; TRINGE, S. G.; QUAN, Z. X.; JETTEN, M. S. M.; CAMP, H. J. M. O. Hydrazine synthase, a unique phylomarker with to study the presence and biodiversity of anammox bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 752-758, 2011.
- HARMS, G.; LAYTON, A. C.; DIONISI, H. M.; GREGORY, I. R.; GARRETT, V. M.; HAWKINS, S. A.; ROBINSON, K. G.; SAYLER, G. S. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science & Technology*, v. 37, p. 343-351, 2003.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, v. 4 (art. 4): 9, 2012.
- HASEBORG, E.; ZAMORA, T. M.; FROHLICH, J.; FRIMMEL, F. H. Nitrifying microorganisms in fixed-bed biofilm reactors fed with different nitrite and ammonia concentrations. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1701–1706, 2010.

- HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 54, p. 33–45, 2008.
- HEULIN, T.; BARAKAT, M.; CHRISTEN, R.; LESOURD, M.; SUTRA, L.; LUCA, G. D.; ACHOUAK, W. *Ramlibacter tataouinensis* gen. nov., sp. nov., and *Ramlibacter henchirensis* sp. nov., cyst-producing bacteria isolated from subdesert soil in Tunisia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 589-594, 2003.
- ISHII, S.; ASHIDA, N.; OTSUKA, S.; SENOO, K. Isolation of oligotrophic denitrifiers carrying previously uncharacterized functional gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, v.77, n. 1, p. 338–342, 2011.
- JETTEN, M. S. M. The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 2903-2909, 2008
- JIANG, C. Y.; DAI, X.; WANG, B. J.; ZHOU, Y. G.; LIU, S. J. *Roseomonas lacus* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 25 – 28, 2006.
- JONES, R. D.; HOOD, M. A. Interaction between an ammonium-oxidizer, *Nitrosomonas* sp., and two heterotrophic bacteria, *Nocardia atlantica* and *Pseudomonas* sp.: a note. *Microbial Ecology*, v. 6, p. 271-275, 1980.
- JUHLER, S.; REVSBECH, N. P.; SCHRAMM, A.; HERMANN, M.; OTTOSEN, L. D.; NIELSEN, L. P. Distribution and Rate of Microbial Processes in an Ammonia-Loaded Air Filter Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, n. 11, p. 3705– 3713, 2009.
- JUNIER, P.; MOLINA, V.; DORADOR, C.; HADAS, O.; KIM, O. S.; JUNIER, T.; WITZEL, K. P.; IMHOFF, J. F. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85:, p. 425–440, 2010.
- KAMPSCHREUR, M. J.; TEMMINK, H.; KLEEREBEZEM, R.; JETTEN, M. S. M.; LOOSDRECHT, M. C. M. V. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research*, v. 43, p. 4093-4103, 2009.
- KIM, D. H.; LIM, W. T.; LEE, M. K.; KIM, M. S. Effect of temperature on continuous fermentative lactic acid (LA) production and bacterial community, and development of LA-producing UASB reactor. *Bioresource Technology*, v. 119, p. 355-361, 2012.
- KINDAICHI, T.; KAWANO, Y.; ITO, T.; SATOH, H.; OKABE, S. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 94, n. 6, p.1111-1121, 2006.
- KONNEKE, M.; BERNHARD, A. E.; TORRE, J. R.; WALKER, C. B.; WATERBURY, J. B.; STAHL, D. A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature Letters*, v. 437, p. 543-546, 2005.
- KOOPS, H.P; POMMERENING-RÖSER, A. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*. v.37, p. 1-9, 2001.
- KOWALCHUK, G. A.; BODELIER, P. L. E.; HEILIG, G. H. J.; STEPHEN, J. R.; LAANBROEK, H. J. Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE, and oligonucleotide probe hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 37, p. 339-350, 1998.
- KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; BROWN, D. R.; HEDLUND, B. P.; PASTER, B. J.; WARD, N. L.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. B. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. Four. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae and Planctomycetes*. Second edition, Springer, Estados Unidos, 949 p., 2010.
- KUBOTA, K.; HAYASHI, M.; MATSUNAGA, K.; IGUCHI, A.; OHASHI, A.; LI, Y. Y.; YAMAGUCHI, T.; HARADA, H. Microbial community composition of a down-flow hanging sponge (DHS) reactor combined with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for the treatment of municipal sewage. *Bioresource Technology*, v. 151, 144-150, 2014.

- 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; p. 5514–5519, 2011.
- LEE, S. H.; KANG, H. J.; LEE, Y. H.; LEE, T. J.; HAN, K.; CHOI, Y.; PARK, H. D. Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full-scale anaerobic digesters. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 14, p. 1893-1905, 2012.
- LIMPIYAKORN, P.; ALMSTRAND, R.; SAMUELSSON, K.; MATTSSON, A.; SORENSSON, F.; LINDGREN, P. E.; HERMANSSON, M. Effects of environmental conditions on the nitrifying dynamics in a pilot wastewater treatment plant. *Environmental Microbiology*, v. 9, n. 9, p. 2220-2233, 2007.
- LIMPIYAKORN, T.; SHINOHARA, Y.; KURISU, F.; YAGI, O. Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 54, n. 205-217, 2005.
- LYDMARK, P.; LIND, M.; SORENSSON, F.; HERMANSSON, M. Vertical distribution of nitrifying populations in bacterial biofilms from a full-scale nitrifying trickling filter. *Environmental Microbiology*, v. 8, n. 11, p. 2036-2049, 2006.
- MA, J.; WANG, Z.; YANG, Y.; MEI, X.; WU, Z. Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454 high-throughput pyrosequencing. *Water Research*, v. 47, p. 859-869, 2013.
- MACHDAR, I.; HARADA, H.; OHASHI, A.; SEKIGUCHI, Y.; OKUI, H.; UEKI, K. Combination of UASB reactor and curtains type DHS (downflow hanging sponge) reactor as a cost effective sewage treatment system for developing countries. *Water Science and Technology*, v. 42, n. 3-4, p. 83-88, 2000.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*, 12ª edição, Editora Artmed, Porto Alegre, 1160p., 2010
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L. I.; JARVIER, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J. B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; McDADE, K. E.; McKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, v. 437, n. 15, p. 376-380, 2005.
- MAGURRAN, A. E. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, 177 p., 1988.
- MARTINEZ-GARCIA, M.; SWAN, B. K.; POULTON, N. J.; GOMEZ, M. L.; MASLAND, D.; SIERACK, M. E.; STEPANAUSKAS, R. High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton. *International Society for Microbial Ecology*, v. 6, p. 113-123, 2012.
- MATSUMOTO, S.; KATOKU, M.; SAEKI, G. TERADA, A.; YOSHITERU, A.; TSUNEDA, S.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Microbial community structure in autotrophic nitrifying granules characterized by experimental and simulation analyses. *Environmental Microbiology*, v.12; n. 1, p. 192-206, 2010.
- MERGAERT, J.; CNOCKAERT, M. C.; SWINGS, J. *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly(ϵ -caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1961-1966, 2003.
- MISSAGIA, B. S. *Estudo das comunidades bacterianas em filtros biológicos percoladores utilizados para o pós-tratamento de efluentes de um reator UASB* (Tese de Doutorado) Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

- MOTA, C.; HEAD, M. A.; RIDENOURE, J. A.; CHENG, J. J.; REYES, F. L. Effects of aeration cycles on nitrifying bacterial populations and nitrogen removal in intermittently aerated reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8565-8572, 2005.
- MULDER, A.; GRAAF, A. A.; ROBERTSON, L. A.; KUENEN, J. G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 16, n. 3, p. 177-184, 1995.
- MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, p. 317-322, 1999.
- NEEF, A.; AMANN, R.; SCHLESNER, H.; SCHLEIFER, K. H. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16s rRNA-targeted probes. *Microbiology*, v. 144, p. 3257-3266, 1998.
- NI, B. J.; ZENG, R. J.; FANG, F.; XIE, W. M.; XU, J.; SHENG, G. P.; SUN, Y. J.; YU, H. Q. Evaluation on factors influencing the heterotrophic growth on the soluble microbial products of autotrophs. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, n. 4, p. 804-812, 2011a.
- NI, B. J.; XIE, W. M.; CHEN, Y. P.; FANG, F.; LIU, S. Y.; REN, T. T. ; SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LIU, G.; TIAN, Y. C. Heterotrophs grown on the soluble microbial products (SMP) released by autotrophs are responsible for the nitrogen loss in nitrifying granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, n. 12, p. 2844-2852, 2011b.
- NI, B. J.; RITTMANN, B. E.; YU, H. Q. Soluble microbial products and their implications in mixed culture biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 9, p. 454-463, 2011c.
- NIELSEN, P. H.; MIELCZAREK, A. T.; KRAGELUND, C.; NIELSEN, J. L.; SAUNDERS, A. M.; KONG, Y.; HANSEN, A. A.; VOLLERTSEN, J. A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Research*, n. 44, p. 5070-5088, 2010.
- NOLL, M.; MATTHIES, D.; FRENZEL, P.; DERAKSHANI, M.; LIESACK, W. Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 3, p. 382-395, 2005.
- OKABE, S., HIRATA, K., WATANABE, Y. Dynamic changes in spatial microbial distribution in mixed- population biofilms: experimental results and model simulation. *Water Science and Technology*, v. 32, n. 8, p. 67-74, 1995.
- OKABE, S., KINDAICHI, T., ITO, T., SATOH, H. Analysis of size distribution and areal cell density of ammonia-oxidizing bacterial microcolonies in relation to substrate microprofiles in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 85, n. 1, p. 86-95, 2004.
- PARK, H. D.; NOGUERA, D.R. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Research*. 38, 3275-3286, 2004.
- PARK, H. D.; WELLS, G. F.; BAE, H.; CRIDDLE, C. S.; FRANCIS, C. A. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 8, p. 5643-5647, 2006.
- 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*, v. 44, p. 5005-5013, 2010.
- PARKER, D.S.; JACOBS, T.; BOWER, E.; STOWE, D.W., FARMER, G. Maximizing trickling filter nitrification rates through biofilm control: research review and full scale application. *Water Science and technology*. v. 36, nº1, p255-262, 1997.
- PEREIRA, L. P. F.; MERCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 31, n. 1, p.81-88, 2005.
- PERSSON P., WIK T., SÖRENSSON F., HERMANSSON M. Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter. *Water Research*, v. 36, p. 1439-1448, 2002.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution*, v. 26, n. 7, p. 1641-1650, 2009.

- RACZ, L. A.; DATTA, T.; GOEL, R. Effect of organic carbonic on ammonia oxidizing bacteria in a mixed culture. *Biosource Technology*, v. 101, p. 6454-6460, 2010.
- RIHS, J. D.; BRENNER, D. J.; WEAVER, R. E.; STEIGERWALT, A. G.; HOLLIS, D. G.; YU, V. L. *Roseomonas*, a new genus associated with bacteremia and other human infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 12, p. 3275-3283, 1993.
- RITTMANN, B.; MC CARTY, P. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. New York: McGraw-hill International Editions, 754 p., 2001.
- RODIER, J. *Análise de las águas naturais, águas residuais e águas dei mar*. Barcelona, Omega. 489 p., 1981.
- ROTTHAUWE, J. H., WITZEL, K. P., LIESACK, W. The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 12, p. 4704 – 4712, 1997.
- ROWAN, K.A.; SNAPE, J.R.; FEARNside, D.; BARER, B.R.; CURTIS, T.P.; HEAD, I.M. Composition and diversity of ammonia-oxidizing bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 43, p. 195-206, 2003.
- SANGWAN, P.; KOVAC, S.; DAVIS, K. E. R.; SAIT, M.; JANSSEN, P. H. Detection and cultivation of soil *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8402-8410, 2005.
- SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; BOCK, E.; FUERST, J.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *Microbiology Reviews*, v. 27, p. 481–492, 2003.
- SCHNEIDER, D.; ARP, G.; REIMER, A.; REITNER, J.; DANIEL, R. Phylogenetic analysis of a microbialite-forming microbial mat from a hypersaline lake of the Kiritimati Atoll, Central Pacific. *Plos One*, v. 8, n. 6, e.66662, 2013.
- SCHOTT, B. M.; GRIFFIN, B. M.; SCHINK, B. Anaerobic phototrophic nitrite oxidation by *Thiocapsa* sp. strain KS1 and *Rhodopseudomonas* sp strain LQ17. *Microbiology*, v. 156, p. 2428-2437, 2010.
- SCHRAMM, A.; BEER, D.; HEUVEL, J. C.; OTTENGRAF, S.; AMANN, R. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. Along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 8, p. 3690-3696, 1999.
- SERKEBAEVA, Y. M.; KIM, Y.; LIESACK, W.; DEDYSH, S. N. Pyrosequencing-based assessment of the bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a Northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions. *Plos One*, v. 8, n. 5, e63994, 2013.
- SHANKS, O. C.; NEWTON, R. J.; KELTY, C. A.; HUSE, S. M.; SOGIN, M. L.; MC LELLAN, S. L. Different geographic locales structures of untreated wastewaters from comparison of the microbial community. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, n. 9, p. 2906-2912, 2013.
- SIRIPONG, S.; RITTMANN, B. E. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, v. 41, p. 1110–1120, 2007.
- SOROKIN, D. Y.; LUCKER, S.; VEJMEJKOVA, D.; KOSTRIKINA, N. A.; KLEEREBEZEM, R.; RIJPSRA, W. I. C.; DAMSTE, J. S. S.; PASLIER, D. L.; MUYZER, G.; WAGNER, M.; LOOSDRECHT, M. C. M. V.; DAIMS, H. Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum *Chloroflexi*. *International Society for Microbial Ecology*, v. 6, p. 2245-2256, 2012.
- SPRING, S.; JACKEL, U.; WAGNER, M.; KAMPFER, P. *Ottowia thiooxydans* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, N₂O-producing bacterium isolated from activated sludge, and transfer of *Aquaspirillum gracile* to *Hylemonella gracilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, p. 99-106, 2004.
- SUDARNO, U.; BATHE, S.; WINTER, J.; GALLERT, C. Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p. 2017–2030, 2010.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

- TANDUKAR, M.; UEMURA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H. Combining UASB and the “fourth generation” down-flow hanging sponge reactor for municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology*, v. 53, n. 3, 209-218, 2006.
- TAWFIK, A.; OHASHI, A.; HARADA, H. Sewage in a combined up-flow anaerobic sludge blanked (UASB)-down-flow hanging sponge (DHS) system. *Biochemical Engineering Journal*. v.29, p. 210-219, 2006.
- TCHOBANOGLOUS, G.; BURTON, F.; STENSEL, H. *Wastewater engineering: treatment, and reuse*. New York: McGraw-Hill, 4th. Edition, 1819 p., 2003.
- TEN, L. N.; JUNG, H. M.; IM, W. T.; OH, H. W.; YANG, D. C.; YOO, S. A.; LEE, S. T. *Dokdonella ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil from a ginseng field, and emended description of the genus *Dokdonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, n. 59, p. 1947-1952, 2009.
- TÓTH, E. M.; BORSODI, A. K.; EUZÉBY, J. P.; TINDALL, B. J.; MÁRIALIGET, K. Proposal to replace the illegitimate genus name *Schineria* Tóth *et al.* 2001 with the genus name *Ignatzschineria* gen. nov. and to replace the illegitimate combination *Schineria* larvae Tóth *et al.* 2001 with *Ignatzschineria* larvae comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, n. 57, p. 179-180, 2007.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. *Wastewater Technology Fact Sheet: Trickling Filters*. Washington D.C., 7 p., 2000.
- 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*, v. 41, n.18, 4149-4163, 2007.
- VERHAGEN, F. J. M.; LAANBROEK, H. J. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 11, p. 3255-3263, 1991.
- VERSTRAETE, W.; ALEXANDER, M. Heterotrophic nitrification by *Artrobacter* sp. *Journal of Bacteriology*, v. 110, n. 3, p. 955-961, 1972.
- VON SPERLING, M. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias Vol. 1. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 3ª ed. 452 p., 2005.
- VON SPERLING, M. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias Vol. 4. Lodos ativadas*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 3ª ed. 428 p., 2012.
- VOS, P. D.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. Three. The Firmicutes*. Second edition, Springer, Estados Unidos, 1422 p., 2009.
- WANG, X.; WEN, X.; CRIDDLE, C.; WELLS, G.; ZHAN, J.; ZHAO, Y. Community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of eight wastewater treatment systems. *Journal of Environmental Sciences*, v. 22, p. 627-634, 2010.
- WANG, X.; HU, M.; XIA, Y.; WEN, X.; DING, K. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n.19, p.7042-7047, 2012a.
- WANG, X.; WEN, X.; XIA, Y.; HU, M.; ZHAO, F.; DING, K. Ammonia oxidizing bacteria community dynamics in a pilot-scale wastewater treatment plant. *Plos One*, v. 7, n. 4, e36272, 2012b.
- 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.; CREASY, T.; DAUGHERTY, S. C.; DAVIDSEN, T. M.; DeBOY, R. T.; DETTER, J. C.; DODSON, R. J.; DURKIN, S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C. S.; KHOURI, H.; KISS, K.; KOTHARI, S. P.; MADUPU, R.; NELSON, K. E.; NELSON, W. C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROSOVITZ, M.; SELENGUT, J. D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S. A.; TAPIA, R.; THOMPSON, 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, n. 7, p. 2046-2056, 2009.
- WEI, B.; YU, X.; ZHANG, S.; GU, L. Comparison of the community structures of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizoplanes of floating aquatic macrophytes. *Microbiological Research*, v. 166, p. 468-474, 2011.
- WELLS, G. F.; PARK, H. D.; YEUNG, C. H.; EGGLESTON, B.; FRANCIS, C. A.; CRIDDLE, C. S. Ammonia-oxidizing communities in a highly aerated full-scale activated sludge bioreactor: betaproteobacterial dynamics and low relative abundance of *Crenarchaea*. *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 9, p. 2310-2328, 2009.
- WHELAN, J. A.; RUSSELL, N. B.; WHELAN, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, n. 278, p. 261-269, 2003.
- WIK, T. Trickling filters and biofilm reactor modeling. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, n. 2, p. 193-212, 2003.
- WITTEBOLLE, L.; VERVAEREN, H.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 1, p. 286-293, 2008.
- WOZNICA, A.; KARCAZ, J.; NOWAK, A.; GMUR, A.; BERNAS, T. Spatial architecture of nitrifying bacteria biofilm immobilized on polyurethane foam in an automatic biodetector for water toxicity. *Microscopy and Microanalysis*, v. 16, p. 550-560, 2010.
- XIE, B.; LV, Z.; HU, CHONG; YANG, X.; LI, X. Nitrogen removal through different pathways in an aged refuse bioreactor treating mature landfill leachate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, 9225-9234, 2013.
- YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; IMACHI, H.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1331-1340, 2006.
- YAMADA, T.; SEKIGUCHI, Y. Cultivation of uncultured Chloroflexi subphyla: significance and ecophysiology of formerly uncultured Chloroflexi "subphylum I" with natural and biotechnological relevance. *Microbes and Environments*, v. 24, n. 3, p. 205-216, 2009.
- YAPSAKLI, K.; ALIYAZICIOGLU, C.; MERTOGLU, B. Identification and quantitative evaluation of nitrogen-converting organisms in a full-scale leachate treatment plant. *Journal of Environmental Management*, n. 92, p. 714-723, 2011.
- YE, L.; SHAO, M. F.; ZHANG, T.; TONG, A. H. Y.; LOK, S. Analysis of the bacterial community in a laboratory-scale nitrification reactor and a wastewater treatment plant by 454-pyrosequencing. *Water Research*, v. 45, p. 4390-4398, 2011.
- YU, Y.; WANG, H.; LIU, J.; WANG, Q.; SHEN, T.; GUO, W.; WANG, R. Shifts in microbial community function and structure along the successional gradient of coastal wetlands in Yellow River Estuary. *European Journal of Soil Biology*, n. 49, p. 12-21, 2012.
- ZHANG, T.; FU, Y. C.; BISHOP, P. (1994). Competition in biofilms. *Water Science and Technology*, v. 29, n° 10-11, p. 263-270, 1994.
- ZHANG, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P.; KIM, H.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1155-1163, 2003.
- ZHANG, X.; YUE, S.; ZHONG, H.; HUA, W.; CHEN, R.; CAO, Y.; ZHAO, L. A diverse bacterial community in an anoxic quinoline-degrading bioreactor determined by using pyrosequencing and clone library analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, p. 425-434, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Concentração de DNA das extrações realizadas

As concentrações médias de DNA das amostras de biomassa congelada extraídas de cada ponto dos FBPs estão apresentadas nas Tabelas 0.3 e 0.4. Foram realizadas duas extrações de DNA (uma em agosto/2011 e outra em fevereiro-março/2012). Para saber quanto de DNA havia em 0,5 g de biomassa congelada, multiplicou-se o volume total da extração purificada (50 µL) pela concentração da amostra (em ng/µL). Os valores foram divididos por 0,5 para se estimar a quantidade de DNA por grama de biomassa e divididos por 1000 para converter ng em µg.

Tabela 0.1 – Estimativa das concentrações médias de DNA por grama de biomassa nos diferentes pontos amostrados do FBP de placa

Período	Profundidade (m)	1ª extração (ng/µL)	2ª extração (ng/µL)	Média ± desvio (ng/µL)	1ª extração (µg/g de biomassa)	2ª extração (µg/g de biomassa)	Média ± desvio (µg/g de biomassa)
P1	1,05	2581,1	2012,5	2296,8 ± 402,1	258,1	201,3	229,7 ± 40,2
	2,10	1876,9	2396,2	2136,6 ± 367,2	187,7	239,6	213,7 ± 36,7
	3,15	1429,8	1973,7	1701,8 ± 384,6	143	197,4	170,2 ± 38,5
	4,20	2175,4	2301	2238,2 ± 88,8	217,5	230,1	223,8 ± 8,9
P2	1,05	2138,5	2329,5	2234,0 ± 135,1	213,9	233	223,4 ± 13,5
	2,10	2061,2	1864,9	1963,1 ± 138,8	206,1	186,5	196,3 ± 13,9
	3,15	1171,9	1696,7	1434,3 ± 371,1	117,2	169,7	143,4 ± 37,1
	4,20	479,3	1247,5	863,4 ± 543,2	47,9	124,8	86,3 ± 54,3
P3	1,05	2286,2	2153,7	2220,0 ± 93,7	228,6	215,4	222,0 ± 9,4
	2,10	1303,7	972,4	1138,1 ± 234,3	130,4	97,2	113,8 ± 23,4
	3,15	281,2	293,1	287,2 ± 8,4	28,1	29,3	28,7 ± 0,8
	4,20	509,8	392,1	451,0 ± 83,2	51	39,2	45,1 ± 8,3

Tabela 0.2– Estimativa das concentrações médias de DNA por grama de biomassa nos diferentes pontos amostrados do FBP de espuma

Período	Profundidade (m)	1ª extração (ng/µL)	2ª extração (ng/µL)	Média ± desvio (ng/µL)	1ª extração (µg/g de biomassa)	2ª extração (µg/g de biomassa)	Média ± desvio (µg/g de biomassa)
P1	1,05	1651,8	1939,1	1795,5 ± 203,2	165,2	193,9	179,5 ± 20,3
	2,10	960,5	1141,2	1050,9 ± 127,8	96,1	114,1	105,1 ± 12,8
	3,15	764,8	1035,9	900,4 ± 191,7	76,5	103,59	90,0 ± 19,2
	4,20	612,2	418,4	515,3 ± 137,0	61,2	41,8	51,5 ± 13,7
P2	1,05	2158,4	2723,6	2441,0 ± 399,7	215,8	272,4	244,1 ± 40,0
	2,10	1030,9	1134,5	1082,7 ± 73,3	103,1	113,45	108,3 ± 7,3
	3,15	803,2	1065,7	934,5 ± 185,6	80,3	106,6	93,4 ± 18,6
	4,20	1085,6	507,3	796,5 ± 408,9	108,6	50,7	79,6 ± 40,9
P3	1,05	1151	692,1	921,6 ± 324,5	115,1	69,21	92,2 ± 32,4
	2,10	748,2	941,7	845,0 ± 136,8	74,8	94,17	84,5 ± 13,7
	3,15	1057,2	1235	1146,1 ± 125,7	105,7	123,5	114,6 ± 12,6
	4,20	575,2	467,2	521,2 ± 76,4	57,5	46,7	52,1 ± 7,6

APÊNDICE B – Estimativas da quantidade de sólidos totais voláteis por compartimento de ambos os FBPs

Tabela 0.3 – Quantidades de biomassa removida do FBP de placa e estimativas das concentrações de STV

Período	Profundidade (m)	Medidas da placa (m)		Área superficial da placa (m ²)	Volume da placa (m ³)	Biomassa fresca removida (g)	STV/ biomassa fresca (g/g)	STV total removido (g)	STV/volume* (kg/m ³)	kg de STV (compartimento)
		Comprimento	Largura							
P1	1,05	0,74	0,35	1,12	0,01	54,48	0,103	5,63	0,67	0,32
	2,10	0,76	0,35	1,15	0,01	153,84	0,092	14,22	1,64	0,78
	3,15	0,74	0,35	1,12	0,01	46,57	0,102	4,76	0,56	0,27
	4,20	0,74	0,35	1,12	0,01	53,18	0,098	5,23	0,62	0,29
P2	1,05	0,74	0,35	1,12	0,01	44,83	0,106	4,75	0,56	0,27
	2,10	0,75	0,35	1,13	0,01	75,40	0,098	7,38	0,86	0,41
	3,15	0,70	0,35	1,06	0,01	47,04	0,069	3,27	0,41	0,19
	4,20	0,71	0,35	1,07	0,01	77,71	0,054	4,22	0,52	0,25
P3	1,05	0,75	0,35	1,13	0,01	36,60	0,088	3,20	0,37	0,18
	2,10	0,74	0,35	1,12	0,01	25,30	0,074	1,88	0,22	0,11
	3,15	0,75	0,35	1,13	0,01	38,52	0,035	1,33	0,16	0,07
	4,20	0,71	0,35	1,07	0,01	66,61	0,053	3,51	0,43	0,21

* Volume de meio-suporte por compartimento: 0,48 m³

Tabela 0.4– Quantidades de biomassa removida do FBP de espuma e estimativas das concentrações de STV

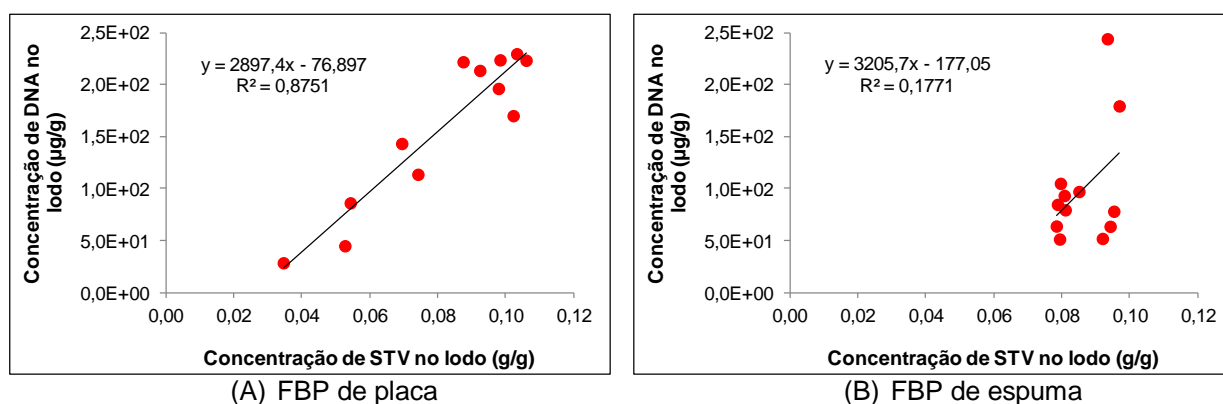
Período	Profundidade (m)	Medidas da espuma (m)			Volume da espuma (m ³)	Biomassa fresca removida (g)	STV/ biomassa fresca (g/g)	STV total removido (g)	STV/volume* (kg/m ³)	kg de STV (compartimento)
		Comprimento	Largura	Altura						
P1	1,05	0,18	0,18	0,015	0,0005	87,37	0,097	8,47	17,92	4,03
	2,10	0,20	0,17	0,015	0,0005	51,12	0,080	4,07	8,19	1,84
	3,15	0,18	0,17	0,015	0,0005	74,60	0,094	7,03	15,32	3,44
	4,20	0,20	0,17	0,015	0,0005	47,84	0,079	3,80	7,45	1,67
P2	1,05	0,17	0,15	0,015	0,0004	107,74	0,093	10,07	27,23	6,11
	2,10	0,17	0,15	0,015	0,0004	114,16	0,085	9,71	26,27	5,90
	3,15	0,20	0,16	0,015	0,0005	125,05	0,081	10,10	21,58	4,85
	4,20	0,17	0,16	0,015	0,0004	82,25	0,081	6,67	16,87	3,79
P3	1,05	0,19	0,17	0,015	0,0005	163,03	0,095	15,55	32,09	7,21
	2,10	0,17	0,16	0,015	0,0004	132,95	0,078	10,43	26,33	5,91
	3,15	0,20	0,17	0,015	0,0005	134,81	0,079	10,62	20,82	4,68
	4,20	0,18	0,17	0,015	0,0004	86,77	0,092	7,98	17,92	4,02

* Volume de meio-suporte por compartimento: 0,22 m³

APÊNDICE C – Análise de correlação entre concentrações de STV e DNA

Valores de concentração de concentração de DNA ($\mu\text{g/g}$ de biomassa congelada; Tabelas 0.1 e 0.2 do Apêndice A) e de STV (g/g de biomassa fresca; Tabelas 0.3 e 0.4 do Apêndice B) foram correlacionados, com o intuito de verificar se a quantidade de DNA varia conforme a quantidade de sólidos orgânicos presentes na biomassa. Os resultados estão apresentados na Figura 0.1, mostrando que essa relação linear provavelmente acontece nas amostras do FBP de placa, enquanto que no FBP de espuma, essa relação não está clara, uma vez que os valores de R^2 foram muito maiores no primeiro FBP (0,87 no FBP de placa e 0,18, no de espuma).

Figura 0.1– Análise da correlação linear entre os valores de STV (g/g de biomassa fresca) e de DNA ($\mu\text{g/g}$ de biomassa congelada) de cada FBP



APÊNDICE D – Quantificação de produtos de PCR para DGGE

Para se padronizar a quantidade de DNA adicionada nos géis de DGGE com o intuito de comparar os perfis de bandas de cada amostra, 2 μL (ou 4 μL) dos produtos de PCR foram previamente quantificados em géis de agarose (2%), como mostrado na Tabela 0.5. Utilizou-se 2 μL *Low Mass Ladder* (Invitrogen), que contém 6 bandas de DNA de diversos tamanhos e quantidades pré-definidas como padrão de referência para quantificação de DNA.

Para quantificação dos produtos de PCR gerados com o par de iniciadores 1055F/ 1392R-GC (para bactérias em geral) e com o par *amoA* 1F-GC / 2R (para bactérias oxidadoras de amônia) que tinham, respectivamente, cerca de 477 pb e 530 pb, foram utilizadas as bandas de 400 pb e de 800 pb do *Low Mass Ladder* como referência. Cada uma dessas bandas continham cerca de 20 e 40 ng respectivamente.

Tabela 0.5 – Estimativa das concentrações de produtos de PCR com *Low Mass Ladder* e programa ImageJ

Amostra	Área (pixels)	Massa de DNA no gel de agarose (ng)	Concentração do produto de PCR (ng/μL)	Massa DNA no gel de DGGE (ng)	Volume de produto de PCR (μL)
P1(1)	16.138.894	68,2	17,1	283,0	16,5
P1(2)	17.733.966	75,0	18,7	283,0	15,1
P1(3)	16.381.723	69,2	17,3	283,0	16,4
P2(1)	16.687.087	70,5	17,6	283,0	16,1
P2(2)	15.919.380	67,3	16,8	283,0	16,8
P2(3)	15.531.773	65,7	16,4	283,0	17,3
P3(1)	16.042.794	67,8	17,0	283,0	16,6
P3(2)	15.301.501	64,7	16,2	283,0	17,5
P3(3)	15.082.187	63,7	15,9	283,0	17,8
P4(1)	16.483.723	69,7	17,4	283,0	16,3
P4(2)	17.148.258	72,5	18,1	283,0	15,6
P4(3)	15.579.430	65,9	16,5	283,0	17,2

Área da banda de referência (20 ng): 4.731.690 pixels

Legenda:

P1(1): profundidade 1,05 m em P1 **P2(2):** profundidade 2,10 m em P2 **P3(3):** profundidade 3,15 m em P3
P1(2): profundidade 1,05 m em P2 **P2(3):** profundidade 2,10 m em P3 **P4(1):** profundidade 4,20 m em P1
P1(3): profundidade 1,05 m em P3 **P3(1):** profundidade 3,15 m em P1 **P4(2):** profundidade 4,20 m em P2
P2(1): profundidade 2,10 m em P1 **P3(2):** profundidade 3,15 m em P2 **P4(3):** profundidade 4,20 m em P3

As imagens dos géis de agarose digitalizadas foram analisadas no programa ImageJ (http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=video:analysis:gel_quantification_analysis), no qual estimou-se a área da intensidade da banda (em pixels) de referência e das amostras. Com os valores das respectivas áreas, por regra de três simples, estimou-se, então, a concentração de DNA presente em cada amostra conforme exemplo mostrado na Tabela 0.3.

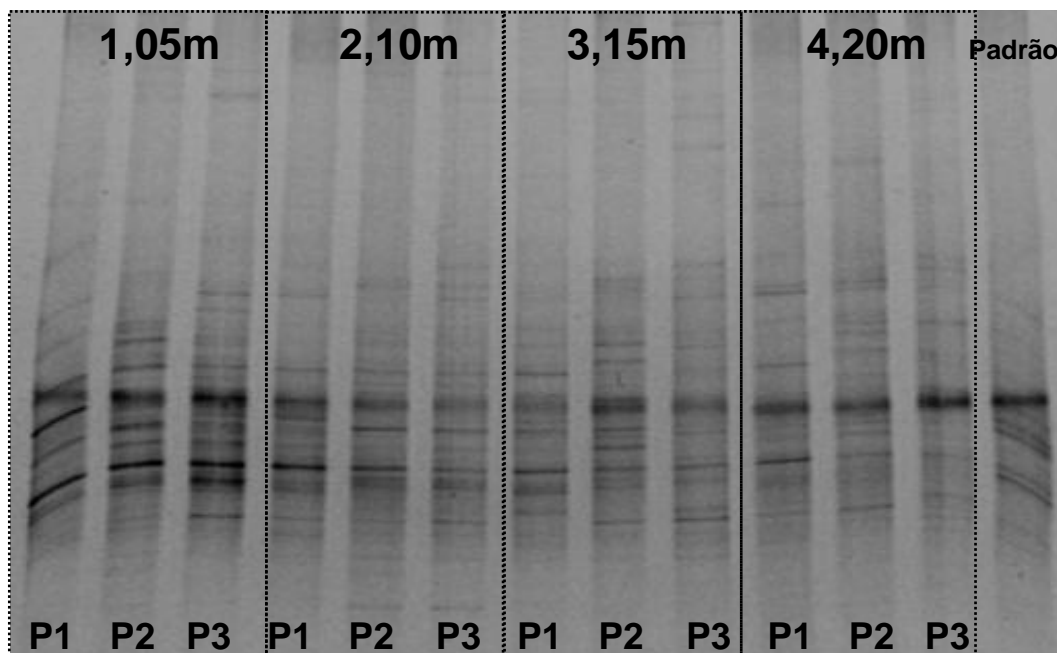
APÊNDICE E – DGGE com iniciadores para genes de RNA 16S de bactérias em geral

As amostras de DNA, juntamente com uma amostra-padrão, foram submetidas a ensaios de PCR com iniciadores 1055F e 1392-RGC (Tabela 5.3). A amostra-padrão era uma mistura de DNA de várias amostras. Os produtos de PCR foram aplicados em géis de poliacrilamida 8% e o experimento conduzido conforme condições descritas no item 5.5.3 da Metodologia.

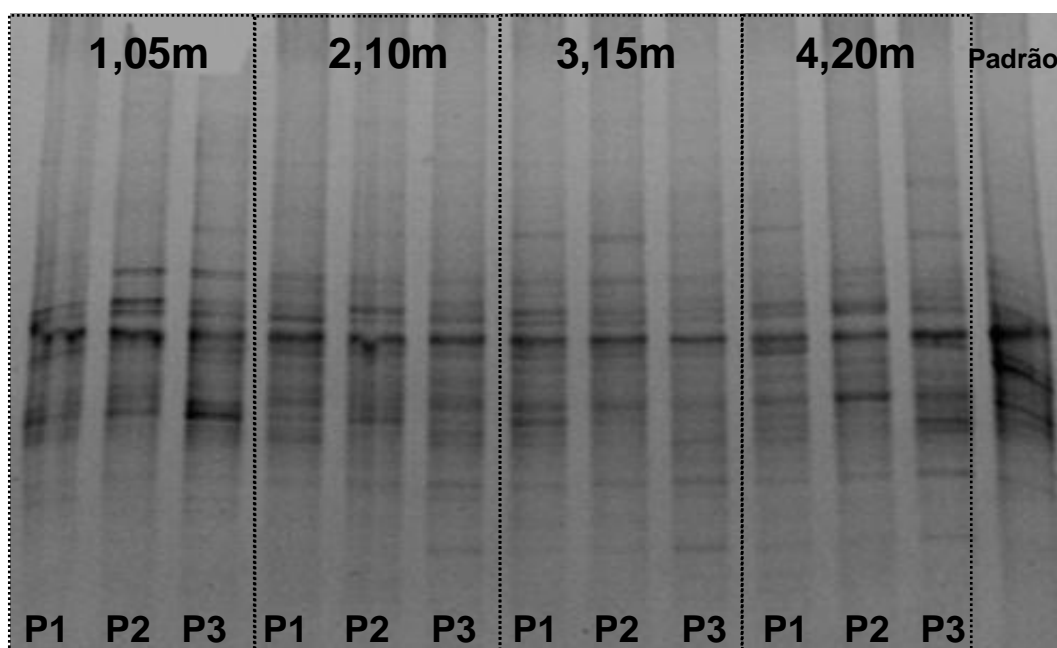
O perfil de bandas gerado pelo produto de PCR da amostra-padrão foi utilizado como referência para avaliação da posição das bandas em geral nos dois géis, no intuito de se comparar e averiguar aquelas que eram comuns ou diferentes entre os mesmos (Figura 0.2). Após essa análise, foi feita uma matriz de presença e ausência de bandas (presente: valor 1;

ausente: valor 0), que foi utilizada nas análises de PCA, cujos resultados estão discutidos nos itens 6.3.3 e 6.3.4.

Figura 0.2 - Perfis populacionais de bactérias em geral nas diferentes profundidades de ambos os FBPs



(A) FBP de placa



(B) FBP de espuma

APÊNDICE F – Purificação de produtos de PCR para sequenciamento

Para cada 45µL de produto de PCR, segue-se o seguinte protocolo:

- 1- Adicionar 11,25 µL de EDTA 125mM e 135 µL de etanol absoluto.
- 2- Centrifugar a mistura em microcentrífuga a 13.000 rpm por 25 minutos em temperatura ambiente. Retirar cuidadosamente o sobrenadante.
- 3- Adicionar 120 µL de etanol 70% para lavar o sedimento. Homegenizar por inversão. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos.
- 4- Descartar o sobrenadante. Deixar o etanol restante evaporar por 20 minutos a 37°C ou *overnight* na temperatura ambiente. Ressuspender o DNA em 10 µL de água ultra-pura estéril.
- 5- Quantificar o produto de PCR purificado com *Low Mass Ladder* conforme explicado no Apêndice D.

APÊNDICE G – Grupos taxonômicos mais abundantes nos FBPs detectados por pirosequenciamento 454

Tabela 0.6 – Descrição resumida dos grupos taxonômicos com abundâncias relativas acima de 3% em pelo menos uma amostra

Filo	Família ou Ordem	Gênero(s) mais abundante(s)	Características fisiológicas	Referência(s)
Acidobacteria	não identificada (classe <i>Chloracidobacteria</i>)	não identificado	Uma espécie descrita, Candidatus <i>Chloracidobacterium thermophilum</i> , isolada de tapetes microbianos de fontes termais. Análises do genoma indicam que é um fotoheterotrófico, entretanto, não foram encontrados genes para síntese de aminoácidos essenciais e de fixação de carbono (não autotrófico), nem para degradação de substratos complexos e de redução de nitrato (não desnitrificante). Crescimento lento (tempo de duplicação: 18h), exige baixas condições nutricionais e utiliza produtos finais da fermentação (acetato, butirato, propionato, lactato e glicolato). Sugere-se que necessita de crescimento em simbiose com outros micro-organismos.	Bryant <i>et al.</i> (2007), Costas <i>et al.</i> (2012)
	Família <i>mb2424</i> (classe <i>Acidobacteria-6</i>)	não identificado	Membros de <i>Acidobacteria</i> são difíceis de cultivar em laboratório, exigem baixas condições nutricionais e longos tempos de incubação (existem representantes cultivados de apenas 5 das 26 subdivisões atualmente existentes). São ubíquos e abundantes em solos, inclusive em ambientes poluídos e extremos, o que sugere que ocupam nichos importantes e potencialmente variados no ambiente. Postula-se que estas bactérias são de vida longa, dividem-se lentamente, exibem taxas metabólicas lentas, sob baixas condições nutricionais, adaptados para tolerar variações hídricas do solo. Detecção de membros da classe em reatores Anammox (pesquisas no DESA).	Ward <i>et al.</i> (2009), Costa <i>et al.</i> (2014)
<i>Chloroflexi</i>	Família <i>A4b</i> (classe <i>Anaerolineae</i>)	não identificado	O filo <i>Chloroflexi</i> inclui bactérias verdes não-sulfurosas. Clones de genes de RNAr 16S têm sido detectados com abundância em vários ambientes, porém há poucos representantes isolados. Os isolados da classe <i>Anaerolineae</i> são anaeróbios, mesofílicos ou moderadamente termofílicos, filamentosos multicelulares, quimiorganotróficos (utilizam carboidratos, aminoácidos ou peptídeos). Apresentam lento crescimento (duplicação celular: 48-92 horas), frequentemente associados com outros micro-organismos (simbiose). Membros dessa classe são importantes tanto para formação de grânulos quanto na formação de <i>bulking</i> em sistemas de tratamento. Estudos em biofilmes nitrificantes autotróficos demonstraram o consumo SMPs, aminoácidos e carboidratos (produtos resultantes de lise celular). Detecção de membros da classe em reatores Anammox (pesquisas no DESA).	Yamada & Sekiguchi (2009), Costa <i>et al.</i> (2014)

Filo	Família ou Ordem	Gênero(s) mais abundante(s)	Características fisiológicas	Referência(s)
Firmicutes	Clostridiaceae	<i>Fusibacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Sarcina</i>	Fusibacter: heterotrófico (fermenta glicose e poucos carboidratos), halotolerante, anaeróbico obrigatório, reduz tiosulfato e enxofre elementar a sulfeto. Duas espécies conhecidas <i>F. paucivorans</i> (isolado de poço de petróleo) e <i>F. tunisiensis</i> (isolado de reator anaeróbico tratando resíduos de oliva). Clostridium: heterotrófico, fermentador de aminoácidos e açúcares, anaeróbico obrigatório, formador de endósporo. Principal habitat é o solo. Sarcina: heterotrófico, fermentador de açúcares, anaeróbico obrigatório, acidotolerante. Encontrado em solo, lama, fezes e conteúdo estomacal.	Vos <i>et al.</i> (2009)
	Peptostreptococcaceae	<i>Peptostreptococcus</i> e outros não identificados	Heterotrófico, anaeróbico obrigatório, fermentador de peptona e aminoácidos, não forma endósporo, membro da microbiota humana intestinal e vaginal.	
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales, ordem Ellin5290	Gemmatimonadaceae e outros não identificados	Gemmatimonadetes: Frequentemente encontrado em bibliotecas de genes de RNAr 16S isolados de solo (média de 2% das sequências). Maiores proporções encontradas em solos áridos, sugerindo adaptação a baixa umidade. Uma espécie conhecida: <i>Gemmatimonas aurantiaca</i> , é um aeróbico, acumulador de polifosfato, heterotrófico, adaptado a baixas concentrações de nutrientes, isolado de um reator em batelada sequencial aeróbico-anóxico.	Zhang <i>et al.</i> (2003), DeBruyn <i>et al.</i> (2011)
Planctomycetes	Gemmataceae	<i>Gemmata</i>	Aeróbicos, possuem estruturas crateriformes distribuídas por toda a célula. Quimiorganotróficos: utilizam como fontes de carbono: monossacarídeos (glicose, galactose, manose, xilose, ribose, ramnose), trissacarídeos (melezitose), salicina e amido.	
	Pirellulaceae	A17	Pirellulaceae: possuem uma organização característica (pirelulossomo), no qual ribossomos e nucleóide condensado estão incluídos por numa membrana intracitoplasmática. Utilizam como fontes de carbono: glicose, galactose, manose, xilose, ribose, fucose, ramnose, celobiose, melizitose, inulina, salicina, amido, dextrina, ácido glucourônico, N-acetilglucosamina, piruvato, pectina, lactose, maltose, melibiose, rafinose, sacarose, trealose. Tolerância máxima a sais é 50% em água do mar artificial.	Krieg <i>et al.</i> (2010)
	Planctomycetaceae	<i>Planctomyces</i>	Aeróbicos ou anaeróbicos facultativos. Ocorrem mundialmente em águas doces eutróficas e oligotróficas, assim como em ambientes marinhos e estuarinos. Frequentemente associados com algas e cianobactérias. Carboidratos têm sido reportados como principal fonte de carbono para membros cultivados do gênero. Crescimento relativamente lento.	
	<i>Phycisphaeraceae</i> e outras não identificadas	não identificado	Quimiorganotrófico. Crescimento em D-xilose sob condições anaeróbicas. Redução de nitrato a nitrito é observada. São β -glucosidase e β -galactosidase positivos.	

Filo	Família ou Ordem	Gênero(s) mais abundante(s)	Características fisiológicas	Referência (s)
Proteobacteria	Caulobacteraceae	<i>Phenyllobacterium</i>	Uma espécie descrita: <i>Phenyllobacterium immobile</i> . Aeróbio obrigatório que utiliza compostos xenobióticos (chloridazon, antipirina e pyramidon) como únicas fontes de carbono. Alta especialização nutricional, cresce também com L-fenilalanina. Isolado de solo.	Brenner et al. (2005b)
	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Bosea</i>	Bradyrhizobium : quimiorganotrófico (utiliza uma ampla variedade de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono), anaeróbio facultativo (desnitrificante). Produz polissacarídeos extracelulares (EPS). Algumas amostras podem crescer autotroficamente a partir de H ₂ e CO ₂ . Capacidade de associar simbioticamente com plantas leguminosas e fixar N ₂ atmosférico. Pode acumular polifosfato e poli-β-hidroxitirato. Bosea : quimiolitoheterotrófico (obtem energia a partir da oxidação de compostos de enxofre reduzidos na presença de carbono orgânico), desnitrificante .	
	Methylocystaceae	<i>Methylosinus</i>	Aeróbio obrigatório, metanotrófico (utiliza metano ou metanol como única fonte de carbono e energia), fixador de N ₂ atmosférico. Encontrado em solo, sedimentos de água doce e águas subterrâneas.	
	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i> , <i>Paracoccus</i>	Rhodobacter : bactéria púrpura fototrófica de metabolismo versátil. Crescimento fotoheterotrófico ocorre sob condições anóxicas na luz com uma variedade de compostos orgânicos (ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, alcoóis, compostos aromáticos) como fonte de carbono e elétrons. Crescimento fotoautotrófico é possível com H ₂ S ou tiosulfato como doador de elétrons. Crescimento heterotrófico no escuro pode ocorrer sob condições aeróbias ou anaeróbias (desnitrificação ou fermentação). Polissacarídeos, ácido poli-β-hidroxitirato e polifosfatos podem ser estocados. Podem fixar N ₂ atmosférico. Encontrada em ambientes de água doce eutróficos e sistemas de tratamento de esgotos. Paracoccus : anaeróbio facultativo, realiza desnitrificação completa . Crescimento quimiorganotrófico ocorre numa ampla variedade de compostos orgânicos. Crescimento quimiolitoheterotrófico ocorre com CO ₂ como fonte de carbono e H ₂ , metanol, metilamina ou tiosulfato como doadores de elétrons. Ocorre em água, solo e em sistemas de tratamento de esgotos.	
	Rickettsiales	não identificado	Intracelular obrigatório, intimamente associado a hospedeiros artrópodes. Todos os membros deste gênero são considerados parasitas ou mutualistas. Infectam células do sistema mononuclear fagocitário, sistema hematopoiético ou endotélio vascular de vertebrados ou tecidos de helmintos e artrópodes.	

Filo	Família ou Ordem	Gênero(s) mais abundante(s)	Características fisiológicas	Referência(s)
Proteobacteria Podem realizar	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i> , <i>Hylemonella</i> , <i>Ramlibacter</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Rubrivivax</i>	Membros desta família são isolados de solo, lodo, água ambientais naturais e industriais, contendo vários gêneros de desnitrificantes . Acidovorax : anaeróbio facultativo (redução de nitrato a nitrito), quimiorganotrófico (utiliza aminoácidos ácidos orgânicos e peptonas, cresce pouco em carboidratos), algumas amostras são quimiolitotróficas. Hylemonella : aeróbio obrigatório, quimiorganotrófico (utiliza somente carboidratos) Ramlibacter : anaeróbio facultativo (redução de nitrato a nitrito), quimiorganotrófico, acumula polihidroxialcanoato. Divisão celular ocorre em cistos e estes são resistentes à dessecação. Comamonas : aeróbio, quimiorganotrófico (utiliza aminoácidos, ácidos orgânicos e peptona, cresce pouco em carboidrato), algumas amostras desnitrificam (redução de nitrato a nitrito). Rubrivivax : bactéria púrpura fototrófica de metabolismo versátil. Crescimento fotoheterotrófico ocorre sob condições anóxicas na luz com uma variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e elétrons. Crescimento fotoautotrófico é possível com H ₂ S ou tiosulfato como doador de elétrons. Crescimento heterotrófico no escuro pode ocorrer sob condições aeróbias ou anaeróbias (desnitrificação ou fermentação).	Brenner <i>et al.</i> (2005b), Spring <i>et al.</i> (2004), Heulin <i>et al.</i> (2003)
	Acetobacteraceae	<i>Roseomonas</i>	A família pertence à ordem <i>Rhodospirillales</i> , conhecida por incluir bactérias púrpuras, de metabolismo extremamente versátil. <i>Roseomonas</i> foi primeiramente descrito em amostras clínicas isoladas de bacteremia e é constituído por bactérias anaeróbias facultativas, capazes de redução de nitrato a nitrito , quimiorganotróficos (oxidam vários carboidratos). Nos últimos anos, bactérias filogeneticamente relacionadas ao gênero têm sido isoladas de vários ambientes, sendo plausível que o gênero inclua espécies fototróficas e oxidadoras de sulfeto.	Jiang <i>et al.</i> (2006); Martinez-Garcia <i>et al.</i> (2012)
	Rhodospirillaceae	não identificado	A família <i>Rhodospirillaceae</i> , que inclui as bactérias púrpuras não sulfurosas, com modo de crescimento preferencialmente o fotoheterotrófico, com metabolismo extremamente versátil. desnitrificação parcial, completa ou fermentação. Polissacarídeos, ácido poli-β-hidroxibutírico e polifosfatos podem ser estocados. Membros dessa família podem também fixar N ₂ atmosférico. São amplamente distribuídos em ambientes de água doce eutróficos e sistemas de tratamento de esgotos	Brenner <i>et al.</i> (2005b).

Filo	Família ou Ordem	Gênero(s) mais abundante(s)	Características fisiológicas	Referência(s)
	<i>Nitrosomonadaceae</i>	não identificado	Aeróbio, quimiolitototrófico (utiliza NH ₄ ⁺ como doador de elétrons e CO ₂ como fonte de carbono).	Brenner <i>et al.</i> (2005b)
	<i>Thiothrichaceae</i>	<i>Thiothrix</i>	Aeróbio obrigatório, mixotrófico (utiliza H ₂ S como doador de elétrons e compostos orgânicos fonte de carbono), algumas amostras podem crescer autotroficamente, utilizando fontes de carbono inorgânico. Acumula grânulos de enxofre intracelularmente.	Brenner <i>et al.</i> (2005a)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Thermomonas</i> , <i>Dokdonella</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i> , <i>Ignatzschineria</i>	<i>Thermomonas</i> : anaeróbio facultativo (redução de nitrato e de nitrito), quimiorganotrófico moderadamente termofílico (crescimento entre 18 e 50°C), hidrolisa gelatina. Espécies <i>T. fusca</i> e <i>T. brevis</i> foram isoladas de biofilme desenvolvido em plástico poly(ε-caprolactone) utilizado como leito fixo de um reator desnitrificante. <i>Dokdonella</i> : aeróbio obrigatório, quimiorganotrófico, hidrolisa esculina, gelatina e caseína. <i>Pseudoxanthomonas</i> : quimiorganotrófico, anaeróbio facultativo (redução de nitrito a N₂O), hidrolisa esculina, ureia, tirosina, caseína e gelatina. Amostras isoladas de diversos ambientes, inclusive solo contaminado com BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno). <i>Ignatzschineria</i> : aeróbio, quimiorganotrófico. Amostras isoladas de trato gastrointestinal de larvas e moscas adultas (ordem <i>Diptera</i> , família <i>Sarcophagidae</i>).	Mergaert <i>et al.</i> (2003), Tóth <i>et al.</i> (2007), Ten <i>et al.</i> (2009)
<i>Verrucomicrobia</i>	Família <i>auto67_4W</i>	não identificado	Algumas amostras descritas na literatura, pertencentes à mesma ordem (<i>Ellin514</i> , <i>Ellin516</i> e <i>Ellin518</i>), foram isoladas de solo por incubação prolongada em meio goma gelana com xilana como única fonte de carbono e o gênero <i>Pedosphaera</i> foi proposto. São cocos sacarolíticos e suas sequências têm sido recuperadas quase inteiramente de solos, onde são tipicamente o segundo grupo mais abundante em nível de classe de <i>Verrucomicrobia</i> , constituindo 0-0,7% do total de clones.	Sangwan <i>et al.</i> (2005); Krieg <i>et al.</i> (2010)
	<i>Chthoniobacteraceae</i>	<i>Chthoniobacter</i> , <i>Candidatus Xiphinematobacter</i> , gênero <i>DA101</i>	<i>Chthoniobacter</i> : aeróbio, heterotrófico, sacarolítico (utiliza mono-, di-, polissacarídeos e derivados), encontrado em solo. <i>Candidatus Xiphinematobacter</i> : bactéria é um simbiote citoplasmático obrigatório com transmissão maternal em nematódeos do grupo <i>Xiphinema americanum</i> .	Krieg <i>et al.</i> (2010);
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	<i>Prostheco bacter</i>	Quimiorganotrófico, oligotrófico, sacarolítico (usa predominantemente mono e dissacarídeos e seus derivados), aeróbio obrigatório.	
<i>WS3</i>	Família <i>PRR-10</i>	não identificado	Poucas informações na literatura. Genes de RNAr1 16S, detectados por pirosequenciamento nas camadas mais profundas (anóxicas) de um tapete microbiano de lago hipersalino. Detecção do filo em reatores Anammox (pesquisas no DESA).	Schneider <i>et al.</i> (2013); Costa <i>et al.</i> (2014)

