

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

AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DE DIFERENTES
ESTRATÉGIAS PARA O ENRIQUECIMENTO DE
BACTÉRIAS ANAMMOX

Betânia Salerno Lara

Belo Horizonte

2009

AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA O ENRIQUECIMENTO DE BACTÉRIAS ANAMMOX

Betânia Salerno Lara

Betânia Salerno Lara

AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA O ENRIQUECIMENTO DE BACTÉRIAS ANAMMOX

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

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

Orientadora: Juliana Calábria de Araújo

Co-orientador: Marcos von Sperling

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

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

Av. Contorno 842 – 7º andar 30110-060 Belo Horizonte – BRASIL

Tel: 55 (31) 3238-1882 Fax: 55 (31) 3238-1882 posgrad@desa.ufmg.br

www.smarh.eng.ufmg.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação e Comparação de Diferentes Estratégias Para o
Enriquecimento de Bactérias Anammox

BETÂNIA SALERNO LARA

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:


Profª. JULIANA CALÁBRIA ARAÚJO


Prof. MARCOS VON SPERLING


Prof. CARLOS AUGUSTO DE LEMOS CHERNICHARO


PESQ. SILVANA DE QUEIROZ SILVA

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH

Versão Final aprovada por

Prof. Mauro da Cunha Naghettini
Coordenador

Profª. Juliana Calábria Araújo
Orientadora

Belo Horizonte, 08 de junho de 2009.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, meu agradecimento especial a DEUS por me dar força a alcançar um de meus maiores sonhos de vida: este mestrado.

Agradeço à minha família, em especial meus pais que foram os grandes responsáveis pelo meu sucesso e à minha irmã Júnia pelo apoio e prestreza incondicionais.

Agradeço às minhas filhas, Paula e Renata, pela paciência dos tantos momentos de ausência familiar e apoio à minha conquista. Elas são, certamente, o meu maior incentivo de vida.

Agradeço aos colegas e amigos do DESA pela amizade, confiança e apoio: Lucilaine, Olívia, Reginaldo, Graziella, Érika Abreu, Valéria, Jacson Lauffer, Paulo Gustavo, Jackson Pereira, Cláudio e Suzy, Roberto, Paula Regina, Danusa, Eliane, Christiny, Wesley, Carol Ventura, Alisson, Ana Raquel, Silvana Queiróz, Ângela Chernicharo, Professora Sílvia e equipe de biologia molecular do laboratório de microbiologia do DESA.

Agradecimentos especiais e muito carinhosos à Iara, Claudinha, Norma e D. Xica pela solidariedade e companheirismo a mim devotados. Vocês sempre estiveram presentes para me incentivar e defender. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Agradecimentos eternos aos Professores do DESA pelo carinho e cordialidade que fui recebida no Departamento, em especial aos Professores Carlos Chernicharo e Marcos Von Sperling pela acolhida no Prosab e confiança no meu trabalho. Agradeço também aos Professores Keller, Walter e Leo Heller pelos bons momentos de descontração no cafezinho e palavras de orientação e incentivo.

E não poderia deixar de agradecer aos meus grandes amigos de vida Paulo Bonifácio (Pabro) e Adriana Alves por tudo que fizeram e fazem para meu crescimento pessoal e espiritual nessa caminhada.

Agradeço à minha orientadora Juliana Calábria pela oportunidade de me incluir neste projeto e pela atenção nas orientações técnicas sempre que necessário e ao co-orientador Marcos Von Sperling pelas palavras de sabedoria.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado neste último ano.

RESUMO

A remoção de nitrogênio é um aspecto importante do tratamento de águas residuárias geralmente realizado por processos microbiológicos tais como nitrificação e desnitrificação. A oxidação anaeróbia da amônia com nitrito levando a N_2 (ANAMMOX) é uma reação mediada por microrganismos, descoberta recentemente, e que apresenta grande potencial para remoção de nitrogênio de águas residuárias. Como os microrganismos capazes de catalisar a reação ANAMMOX são difíceis de cultivar em cultura pura (até o momento nenhuma espécie foi isolada), a forma de se estudar essa população é através de técnicas de enriquecimento e cultura mista. O presente trabalho testou e comparou diferentes estratégias para permitir o enriquecimento de bactérias ANAMMOX, a partir de amostras de lodo provenientes de reator UASB e de sistema de lodos ativados, utilizados no tratamento de esgoto doméstico. As três estratégias usadas foram: (i) enriquecimento em reator batelada com adição de amônia e nitrito (reatores F4 e F5), (ii) enriquecimento em reator sequencial em batelada (reatores F1 e F2), e, (iii) em reator batelada com adição de cloranfenicol (reatores F3 e F6). Além disso, foi feito um reator controle contendo apenas o meio de cultura autotrófico (sem inóculo). Os reatores foram incubados a 37°C , sob agitação, e monitorados quanto ao consumo dos compostos nitrogenados amônia e nitrito, por um período que variou de 231 a 455 dias. Para todos os reatores, observou-se que o processo verificado ao longo do tempo de incubação foi o de desnitrificação (evidenciado pelo intenso consumo de nitrito), independente da estratégia usada, bem como do tipo e da concentração de inóculo. O tempo de duração da atividade desnitrificante variou para cada reator. Nos reatores F3 e F6, em alguns momentos, foi possível diminuir esta atividade, mas não eliminá-la completamente. Nos reatores F1 e F2 verificou-se que houve desnitrificação, porém num período muito curto e no início da operação dos reatores, evidenciando que a troca periódica de meio foi importante para eliminar esta atividade. Não obstante, não foi observada atividade ANAMMOX nestes reatores. A atividade desnitrificante verificada deve ter sido favorecida pela condição em batelada dos reatores, permitindo com que as bactérias heterotróficas do lodo sobrevivessem durante todo o processo, pois apesar do meio ser desprovido de fonte de carbono, estas bactérias conseguem viver dos compostos oriundos da lise celular das outras bactérias, além de poderem utilizar tanto o nitrito como o nitrato como aceptores de elétrons. Em resumo, não foi observado, nos seis reatores testados, consumo simultâneo de amônia e de nitrito, o que indicaria oxidação da amônia sob condições anaeróbias. Portanto, não foi possível enriquecer bactérias ANAMMOX nas condições usadas neste trabalho.

ABSTRACT

Nitrogen removal is an important aspect of wastewater treatment often accomplished by microbial processes such as nitrification and denitrification. The anaerobic ammonia oxidation (ANAMMOX) to N_2 with nitrite as electron acceptor is a microbial process discovered recently, which shows great potential for nitrogen removal from wastewaters. Since the microorganisms able to perform the ANAMMOX reaction are difficult to cultivate in pure culture (one single specie has not been isolated yet), the way to study this population is through the application of enrichment and cultivation techniques. The present work has tested and compared different approaches for the enrichment of ANAMMOX biomass. Municipal activated sludge and anaerobic sludge from an UASB reactor, both used in domestic sewage treatment, were used as inocula. The three approaches used were: (i) enrichment in batch reactors containing autotrophic basal medium with ammonium and nitrite (reactors F4 and F5); (ii) enrichment in sequencing batch reactors (F1 and F2), and (iii) batch reactors with basal medium supplemented with chloramphenicol (reactors F3 and F6). One control reactor with only autotrophic basal medium (without inoculum) was also prepared. Reactors were incubated at 37°C in a shaker-incubator, and nitrite and ammonium consumptions were monitored during the incubation time which ranged from 231 to 455 days. In all reactors denitrification process was observed during the incubation time (as indicated by intense nitrite consumption), and this was not coupled to the approach used, as well as inoculum type and concentration. The duration of denitrification activity time varied for each reactor. In F3 and F6 sometimes this activity decreased, but it was not completely eliminated. In F1 and F2 reactors denitrification occurred but only in the initial stages of incubation, indicating that culture medium exchanges were important to eliminate this activity. Nevertheless, ANAMMOX activity was not observed in these reactors. Denitrifying activity might have been the favoured process by the stagnant condition of batch culture reactor, which allowed that heterotrophic biomass survived during the whole process. This is probably because heterotrophic biomass is able to live on cell lysis products and from biodegradable substrate in the influent even in the absence of oxygen, since these organisms can use nitrate and nitrite as electron acceptor. In summary, in the six reactors tested a simultaneous consumption of ammonium and nitrite, indicating anaerobic ammonium oxidation activity, was not observed. Therefore, ANAMMOX organisms were not enriched under the conditions used in this work.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	Estratégias utilizadas para o enriquecimento da ANAMMOX	50
4.2	Lodo de inóculo para os reatores.....	50
4.3	Preparo dos reatores e do meio de cultura	51
4.4	Montagem e características dos reatores.....	53
4.5	Operação e monitoramento dos reatores	56
4.5.1	Operação dos reatores	56
4.5.2	Monitoramento analítico dos reatores	58
4.6	Procedimentos das análises físico-químicas.....	60
4.6.1	Determinação de amônia.....	60
4.6.2	Determinação de nitrito	61
4.6.3	Determinação de nitrato	62
4.6.4	Determinação dos sólidos totais e voláteis	63
4.6.5	Medição de pH	64
4.7	Preparo das soluções de uso no meio de cultura e na operação dos reatores	65
4.8	Análise por FISH.....	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1	Caracterização do lodo de inóculo.....	67
5.2	Avaliação da atividade ANAMMOX nos reatores em batelada F3 e F4 inoculados com lodo ativado	68
5.3	Avaliação da atividade ANAMMOX nos reatores em batelada F5 e F6 inoculados com lodo anaeróbio	74
5.4	Avaliação da atividade ANAMMOX nos reatores em batelada sequencial F1 e F2 inoculados com lodo anaeróbio	79
5.5	Resultado do reator controle (usado sem biomassa)	84
5.6	Resultados da análise de hibridação “in situ” com sondas fluorescentes (FISH) com a sonda Amx820	855
5.7	Resumo dos resultados obtidos nos enriquecimentos e comparação com outros Trabalhos	86
6	CONCLUSÃO	912
7	RECOMENDAÇÕES.....	93
	ANEXO I - Preparo das soluções.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Ciclo microbiológico do nitrogênio	20
Figura 3.2 - Rotas biológicas viáveis da redução do nitrito	21
Figura 3.3 – Relação entre amônia livre e ionizada em função do pH	22
Figura 3.4 - Ciclo do NO _x - modelo hipotético da oxidação anaeróbia da amônia por Nitrosomonas NO ₂ - dependente	24
Figura 3.5 – Provável rota metabólica da oxidação anaeróbia da amônia.....	28
Figura 3.6 - Mecanismo de oxidação anaeróbia da amônia.....	31
Figura 3.7 - Distribuição geográfica da bactéria ANAMMOX na Europa.....	33
Figura 3.8 - Representação esquemática da técnica de hibridação <i>in situ</i> com sondas fluorescentes (FISH).....	45
Figura 4.1 - (A) Foto da etapa de recirculação do decantador secundário do sistema de lodos ativados da ETE Arrudas COPASA (vazão média de 1,86m ³ /s) e (B) do reator UASB do CePTS	51
Figura 4.2 - Desenho esquemático do procedimento de manipulação dos reatores, com relação à retirada de meio líquido para posteriores análises físico-químicas e/ou adição de soluções ao reator.	58
Figura 4.3 - Foto dos reatores, caixas de alumínio contendo as seringas, agulhas estéreis e meio de cultura estéril dentro do fluxo laminar.	59
Figura 4.4 - Reação química da amônia com fenol para formar o indofenol na análise de amônia.	60
Figura 4.5 - Reação química do nitrito com ácido sulfanílico e acoplamento do N-naftil para formar o azo corante na análise de nitrito.	62
Figura 5.1 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F3 ao longo dos 429 dias de operação... ..	71
Figura 5.2 - Eficiência de remoção de amônia e nitrito pelo lodo cultivado no reator F3 ao longo do tempo de operação.....	72
Figura 5.3 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F4 ao longo dos 240 dias de operação... ..	73
Figura 5.4 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F5 ao longo de 230 dias de operação.....	75
Figura 5.5 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F6.	78
Figura 5.6 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F1.....	80
Figura 5.7 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F6.....	82
Figura 5.8 - Perfil do pH dos reatores F5 e F6 ao longo do período de operação, em função da concentração de amônia efluente.	83
Figura 5.9 - Monitoramento da concentração de nitrito e amônia no meio de cultura do reator controle (Fc)	84
Figura 5.10 - Performace da planta com Anammox em Rotterdam em 2009.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Comparação dos parâmetros fisiológicos entre ANAMMOX e nitrificantes	29
Tabela 3.2 – Dados de conversão de N dos reatores em planta piloto e escala real operados com processo ANAMMOX	34
Tabela 3.3 - Experimentos no enriquecimento de ANAMMOX operados em batelada.....	36
Tabela 3.4 - Experimentos de enriquecimento de ANAMMOX operados em modo sequencial em batelada	38
Tabela 3.5 - Características operacionais de sistemas biológicos para remoção de nitrogênio em águas residuárias	40
Tabela 3.6 - Sondas de oligonucleotídeos usadas no FISH para detectar <i>Planctomicetos</i> e bactéria ANAMMOX.....	47
Tabela 3.7 - Investigação da presença de organismos ANAMMOX em diferentes sistemas de remoção de nitrogênio (de acordo com Jetten <i>et al.</i> , 2002)	48.
Tabela 4.1 - Composição do meio mineral autotrófico	52
Tabela 4.2 - Composição das soluções de micronutrientes	52
Tabela 4.3 - Características dos reatores e tempo de operação	55
Tabela 4.4 - Frequência das análises de cada reator	59
Tabela 4.5 - Métodos analíticos utilizados	60
Tabela 5.1 - Resultado de sólidos totais voláteis do lodo de inóculo	68
Tabela 5.2 - Resultados da técnica de FISH de amostras dos reatores em diferentes tempos de operação	85
Tabela 5.3 - Resumo dos experimentos realizados e atividades metabólicas verificadas nos reatores a partir das variações nos compostos nitrogenados	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANAMMOX - *Anaerobic Ammonium Oxidation*

CANON - *Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrite*

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente

COPASA – Companhia de Saneamento de Minas Gerais

DAPI - 4',6' - diamidino-2-fenilindol

DNA - ácido desoxirribonucléico

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

ΔG° – variação da energia livre de Gibbs

mM - milimolar

N-NH₄⁺ - nitrogênio amoniacal

N-NO₂⁻ - nitrogênio nitroso

N-NO₃⁻ - nitrogênio nítrico

OLAND - *Oxygen Limited Autotrophic Nitrification and Denitrification*

PCR - *Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase

RBC – *Rotating Biological Contactor*

RPM - rotação por minuto

RNAr - ácido ribonucléico ribossomal

SBR – *Sequencing Batch Reactor* (reator sequencial em batelada)

SHARON – *Single Reactor System for High Ammonium Removal Over Nitrite*

SSV – sólidos suspensos voláteis

STV - sólidos totais voláteis

TDH – tempo de detenção hidráulica

UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*

1 INTRODUÇÃO

A água é o recurso natural mais importante que participa e dinamiza todos os ciclos ecológicos. O uso diversificado dos recursos hídricos gera um grande impacto na economia regional e nacional, uma vez que os impactos quantitativos e qualitativos provocados demandam custos para recuperação e tratamento da água e dos ecossistemas aquáticos. Água de má qualidade empobrece as populações locais e de outras regiões, impedindo a obtenção de uma boa qualidade de vida, além de interferir na economia regional e destruir alternativas saudáveis de desenvolvimento sustentável. Um exemplo é a descarga de fontes difusas e pontuais de nitrogênio e fósforo em rios, lagos e represas, a partir de esgotos não tratados e do uso de fertilizantes, produzindo o fenômeno de eutrofização, cujo efeito ecológico na saúde humana e nos custos do tratamento de água é relevante, especialmente em regiões de intensa urbanização (TUNDISI, 2003). Segundo Randall¹ *et al.*, *apud* Chernicharo (2007), a descarga de nutrientes como o fósforo e o nitrogênio em cursos de água superficiais leva à diminuição dos níveis de oxigênio e ao aumento da biomassa algal. Sabe-se que 1Kg de fósforo pode resultar na reconstrução de 111 Kg de biomassa (correspondendo a 138 Kg de demanda química de oxigênio no corpo receptor), enquanto similarmente a descarga de 1 Kg de nitrogênio pode resultar na reconstrução de cerca de 20 kg de demanda química de oxigênio, na forma de algas mortas.

A eutrofização e a intoxicação de peixes têm sido a causa de parte destes problemas em corpos de água receptores, devido à presença de compostos nitrogenados, como o nitrogênio amoniacal. Sob o ponto de vista de saúde pública, o nitrato é agente causador da metaemoglobinemia (Síndrome do bebê azul), além de causar danos à saúde animal, enquanto o nitrito pode ser o responsável pela formação de substâncias de poder mutagênico e carcinogênico (DEEB *et al.*, 1975). Ainda conforme Bouchard *et al.* (1992), uma contaminação em águas subterrâneas com nitrato é pandêmica e os custos com a recuperação destas águas são elevados.

O valor permissível de nitrogênio amoniacal para lançamento de efluentes de qualquer fonte poluidora está temporariamente suspenso, segundo a Resolução Nº 397/08 do CONAMA, a qual alterou o artigo 34 da Resolução Nº 357/05 do CONAMA, que preconiza o teor máximo de lançamento em 20 mg.L⁻¹. Já o teor de nitrogênio amoniacal

¹ RANDALL, *et al.* Design and retrofit of waterwater treatment plants for biological nutrient removal. *Technomic Publ. AG*, Brasil, Switzerland, 1992, 416p.

total nos corpos hídricos depende da classe a que está classificada, podendo variar de 0,4 a 13,3 mg N-NH₄⁺, dependendo da faixa de pH e alcalinidade apresentados.

Convencionalmente, a remoção biológica do nitrogênio é feita através do processo de nitrificação, seguido de desnitrificação. Nitrificação combinada com desnitrificação é um método muito usado para controle de nitrogênio no tratamento de águas residuárias (MULDER *et al.*, 1995).

Nitrificação é um processo aeróbio, onde bactérias autotróficas (geralmente *Nitrosomonas sp*) oxidam o íon amônio (NH₄⁺) a nitrito (NO₂⁻) e, posteriormente, o NO₂⁻ é oxidado a nitrato (NO₃⁻) pelas bactérias *Nitrobacter sp.* e *Nitrospira sp.*, tendo o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons. Na desnitrificação, os íons NO₂⁻ e NO₃⁻ são reduzidos a nitrogênio gasoso (N₂) por bactérias desnitrificantes que utilizam NO_x⁻ como acceptor alternativo de elétron. A desnitrificação é realizada por amplo espectro de bactérias, representando a maioria dos gêneros e tipos fisiológicos (ZUMFT, 1992).

Teoricamente, o íon amônio também pode ser usado como doador inorgânico de elétrons para a reação de desnitrificação autotrófica, sendo favorável energeticamente na reação de nitrificação. Sendo assim, Broda (1977) publicou um artigo teórico descrevendo o potencial de existência de bactérias quimiolitotróficas com habilidades para oxidar amônia a gás nitrogênio, com nitrato, dióxido de carbono ou oxigênio como oxidante. Esta teoria foi baseada em cálculos termodinâmicos, pois, naquela época, estes microorganismos ainda não tinham sido descobertos, ou sequer se tinha notícia da existência deles na natureza ou em sistemas de engenharia.

Em um reator desnitrificante de leito fluidizado, operado para o tratamento de resíduos de uma planta de produção de fermento, em Delft, na Holanda, Mulder *et al.* (1995) observaram o desaparecimento do íon amônio (NH₄⁺) sob condições anóxicas. Neste reator, o consumo de amônia e nitrato foi crescente, com concomitante produção de gás nitrogênio. Após análise dos resultados, os autores concluíram que a amônia estava sendo oxidada sob condições anaeróbias, a partir da utilização de nitrato como acceptor final de elétrons e formação de nitrogênio gasoso. Esse novo processo biológico de remoção de nitrogênio foi denominado e patentado como ANAMMOX (*Anaerobic Ammonium Oxidation*).

A reação ANAMMOX simplificada pode ser escrita da seguinte forma:



A partir desta descoberta, diversos estudos vem sendo realizados utilizando-se diferentes tipos de reatores com o intuito de elucidar o processo ANAMMOX, envolvendo grupos de pesquisadores de universidades de diversos países como: Holanda (VAN de GRAAF, 1997; STROUS *et al.*, 1998; JETTEN *et al.*, 1999; VAN der STAR *et al.*, 2007), Espanha (DAPENA-MORA *et al.*, 2004; TRIGO *et al.*, 2006), Suíça (EGLI *et al.*, 2001; FUX *et al.*, 2002), Brasil (REGINATTO *et al.*, 2005; KUNZ *et al.*, 2007; ARAÚJO & CHERNICHARO, 2007), Tailândia (CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007), Japão (WAKI *et al.*, 2007), dentre outros.

As bactérias ANAMMOX foram detectadas em vários ecossistemas marinhos e de água doce. Segundo Jetten *et al.* (2004), elas se mostraram muito importantes no ciclo oceânico do nitrogênio, com uma contribuição de produção de N₂ calculado em 30-50% da taxa de *Redfield*². Além disso, foram também detectadas em várias estações de tratamento de efluentes na Alemanha (HELMER *et al.*, 1999), Suíça (EGLI *et al.*, 2001), Inglaterra (SCHMID *et al.*, 2003), Bélgica (PYNAERT *et al.*, 2003) e Austrália (TOH *et al.*, 2002).

A aplicação do processo ANAMMOX é considerada uma boa alternativa para a remoção de nitrogênio no tratamento de águas residuárias com elevadas concentrações de nitrogênio e baixas concentrações de matéria orgânica, podendo reduzir os custos operacionais com aeração e adição de fonte de carbono, se comparado ao processo convencional de nitrificação e desnitrificação (JETTEN *et al.*, 2001; VAN DONGEN *et al.*, 2001). Não obstante, a aplicação do processo ANAMMOX é limitada pela disponibilidade de biomassa ANAMMOX. Uma pesquisa recente desenvolvida por Waki *et al.* (2007) estudou a aplicação do processo ANAMMOX em reatores de desodorização de águas residuárias.

Os organismos ANAMMOX estão classificados no grupo dos Planctomicetos (ordem *Planctomycetales*), cinco dos quais foram denominados provisoriamente de *Brocadia fulgida* (KARTAL *et al.*, 2004), *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus anammoxoglobus propionicus* (KARTAL *et al.*, 2007) e *Candidatus Jettenia asiatica* (QUAN *et al.*, 2008),

² Taxa de *Redfield*: valor ótimo para que não ocorra limitação por nitrogênio ou fósforo (Jetten *et al.*, 2005).

que se constituem em um interessante grupo de bactérias com propriedades raras ou únicas. Elas apresentam morfologia de cocos com diâmetro menor que 1 μm (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004), tempo de duplicação de aproximadamente 11 dias e são fisiologicamente distintas dos outros membros da ordem *Planctomycelates*, pois são anaeróbias e quimiolitotróficas. Nenhuma bactéria ANAMMOX ainda não foi isolada; portanto, técnicas moleculares como a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são essenciais para o futuro das pesquisas com estas bactérias (SCHMID *et al.*, 2005).

Diversas pesquisas demonstraram que uma eficiente retenção de biomassa pode ser necessária para manter a biomassa ANAMMOX no reator, uma vez que possui um longo tempo de duplicação, precisando então longo tempo na partida dos reatores para o crescimento suficiente de biomassa.

O isolamento e enriquecimento de biomassa ANAMMOX, a partir de uma comunidade bacteriana mista, requer a otimização das condições, favorecendo o processo ANAMMOX, enquanto limita o crescimento dos outros tipos de microrganismos. Em particular, uma vez que o processo ANAMMOX é anaeróbio, a exclusão de oxigênio é essencial, especialmente durante a partida dos reatores.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa foi testar e comparar diferentes estratégias para permitir o enriquecimento de bactérias ANAMMOX, a partir de amostras de lodo provenientes de reator UASB e de sistema de lodos ativados, utilizados no tratamento de esgoto doméstico.

Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade ANAMMOX de diferentes lodos (aeróbio e anaeróbio) em reatores batelada, de modo a selecionar um lodo com biomassa ANAMMOX ativa;
- Avaliar a influência da adição do antibiótico cloranfenicol sobre as bactérias desnitrificantes e, conseqüentemente, sobre o enriquecimento das ANAMMOX;
- Enriquecer bactérias ANAMMOX, a partir do lodo selecionado, em reatores de batelada alimentada;
- Confirmar a presença de bactérias ANAMMOX enriquecidas em reatores pela técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH);
- Identificar limitações da estratégia proposta.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O metabolismo microbiano do nitrogênio e suas formas presentes na natureza

O nitrogênio é um elemento essencial para os organismos vivos, estando presente em compostos como aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos. A atmosfera terrestre contém 80% de nitrogênio molecular, o qual é inerte quimicamente e não pode ser usado diretamente como fonte de nitrogênio, exceto por algumas espécies de bactérias (VAN de GRAAF, 1997).

O suprimento, bem como a ciclagem ambiental das formas disponíveis deste elemento, é dependente da decomposição biológica do nitrogênio, presente nos componentes acumulados dentro da biota (PRATES³ apud KIELING, 2004).

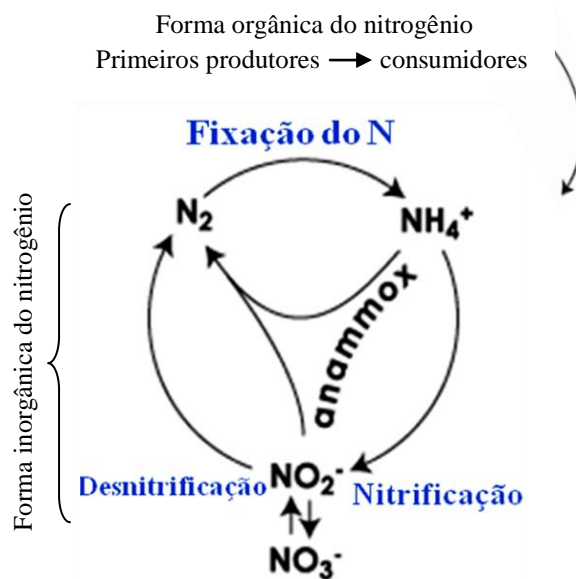
Segundo Jetten *et al.* (2005), as bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia têm um papel no ciclo marinho do nitrogênio, podendo ser responsáveis por 50% da produção do nitrogênio (N₂) marinho. Outra participação do nitrogênio no ciclo é na forma de nitrogênio orgânico através de atividades antrópicas (via fábricas e esgotos domésticos, por exemplo). Atividades humanas, industriais e da agricultura têm aumentado fortemente a quantidade de compostos nitrogenados biologicamente ativos no meio ambiente causando, conseqüentemente, distúrbios no balanço natural do ciclo do nitrogênio (VAN de GRAAF, 1997).

O metabolismo microbiano do nitrogênio desempenha um papel importante no ciclo global do composto através de atividades como a desnitrificação e ANAMMOX (Figura 3.1). Tais processos são os maiores mecanismos que convertem nitrogênio combinado a nitrogênio gasoso, completando assim o ciclo. Ao mesmo tempo, atividades microbianas contribuem para a produção de gases de efeito estufa, tais como óxidos nítrico e nitroso na atmosfera (YE & THOMAS, 2001).

Na Figura 3.1 estão representadas as transformações dos compostos nitrogenados no ciclo do nitrogênio resultantes do metabolismo microbiano nos processos de fixação,

³ PRATES, K.V.M.C.. “Verificação da produção Biológica de Nitrogênio a partir de Lodos Anaeróbios Granulados Cultivados em Meio Contendo Nitrogênio Amoniacal e Baixas Concentrações de Compostos Orgânicos”. 1997. *Dissertação (Mestrado)*. Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, 1987.

nitrificação, desnitrificação e oxidação anaeróbia do amônio usando o nitrito como acceptor final de elétrons (ANAMMOX).



(Fonte: disponível em <http://www.anammox.com/research>)

Figura 3.1 - Ciclo microbiológico do nitrogênio com os processos de nitrificação, desnitrificação, fixação de nitrogênio e ANAMMOX

Na fixação biológica do nitrogênio, dinitrogênio é reduzido a amônia e subsequentemente transferido aos aminoácidos e assimilado para dentro do material celular. Por outro lado, a amônia é liberada dos compostos nitrogenados orgânicos através da atividade microbiológica denominada amonificação ou mineralização. Amônia (NH_3) é a forma de nitrogênio mais frequentemente encontrada na biosfera, sendo transferida eficientemente a longas distâncias por volatilização. Em contraste, o nitrito é usualmente encontrado em quantidades traço em *habitats* aeróbios acumulando-se em solos com alto potencial hídrico. Na presença de oxigênio, amônia e nitrito não são estáveis e são convertidos a nitrato pelas bactérias nitrificantes (nitrificação). Em águas marinhas e frescas, bem como no solo, o nitrito gerado pelas bactérias oxidadoras de amônia é imediatamente consumido pelas bactérias oxidadoras de nitrito, sendo assim mantido em concentrações baixas nestes ambientes. O nitrato pode ser assimilado pelas plantas e microorganismos, o qual sob condições anóxicas ou de limitação de oxigênio, é usado como acceptor de elétrons na desnitrificação (se houver doador de elétrons disponível). Completando o ciclo do nitrogênio, o nitrato pode ser convertido a gás nitrogênio por desnitrificação (BOCK & WAGNER, 2006).

As bactérias ANAMMOX têm um papel significativo no ciclo global no nitrogênio como agente da regeneração molecular do nitrogênio, em condições anóxicas (BITTON, 2005).

As transformações cíclicas dos compostos nitrogenados têm importância para o retorno do nitrogênio para a biosfera. Espécies como *Rhizobium*, *Azobacter* e *Azospirillum* são importantes para a fixação biológica do nitrogênio gasoso a amônia. Animais e microorganismos dependem da forma fixada de nitrogênio para sua nutrição (VAN de GRAAF, 1997).

Ainda no ciclo do nitrogênio, três diferentes caminhos da redução do nitrato são conhecidos: redução do nitrato a amônia (assimilatória ou dissimilatória) e redução do nitrato a gás nitrogênio chamado desnitrificação (Figura 3.2). Este processo também conduz à produção de óxido nítrico e óxido nitroso (VAN de GRAAF, 1997).

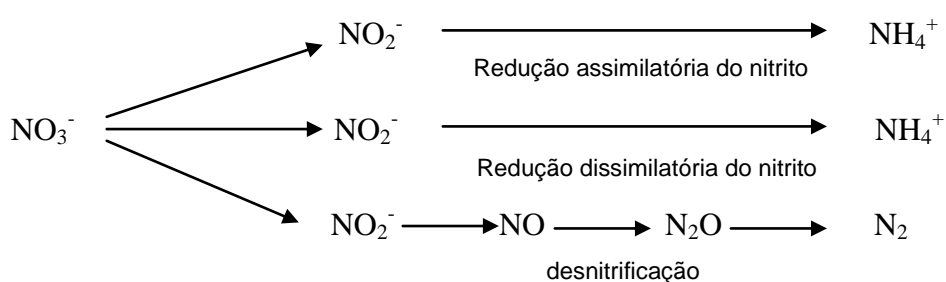
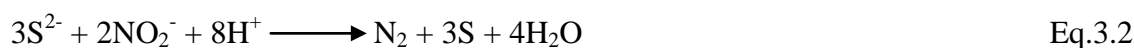
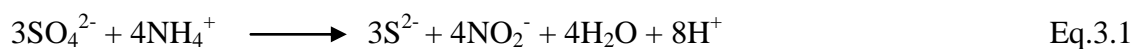


Figura 3.2 - Rotas biológicas viáveis da redução do nitrato

Na complexidade das reações que envolvem o metabolismo biológico do nitrogênio, podem ocorrer processos competitivos pelo mesmo substrato. Segundo Polanco *et al.* (2001), os caminhos de degradação do nitrogênio e enxofre podem interagir em vários níveis. Num destes, bactérias redutoras de sulfato podem competir com microorganismos desnitrificantes pelo carbono orgânico e utilizar a maior parte da fonte de carbono adicionada ao processo de desnitrificação em águas residuárias. Além disto, o sulfeto pode ser doador de elétrons sendo reoxidado a enxofre elementar (S^0) ou sulfato (SO_4), onde o *Thiobacillus denitrificans* usam o nitrato como acceptor de elétrons. Em seu experimento, Polanco *et al.* (2001) postularam um mecanismo de oxidação-redução para explicar um procedimento anômalo encontrado em seu sistema, segundo as reações abaixo. A reação bioquímica total pode ser obtida por combinação de dois sistemas que envolvem a formação de nitrito e reação ANAMMOX:



Deste experimento, um reator anaeróbio fluidizado carbono ativado granular (GAG), tratando vinhaça diluída de destilaria de melaço de açúcar, mostrou um procedimento anormal em termos de altas concentrações de nitrogênio molecular no biogás. Análises de compostos de nitrogênio e enxofre e o balanço de massa destas espécies indicaram claramente a evolução incomum de nitrogênio e enxofre no reator.

Fonte de nitrogênio orgânico lançado no meio aquático provém de fontes naturais, antropogênicas, de deposição atmosférica, e de processos produtivos (SEITZINGER, 2002). O nitrogênio amoniacal se apresenta num equilíbrio entre forma não ionizada e ionizada, dependente do pH, conforme a equação 3.4 e a Figura 3.3.

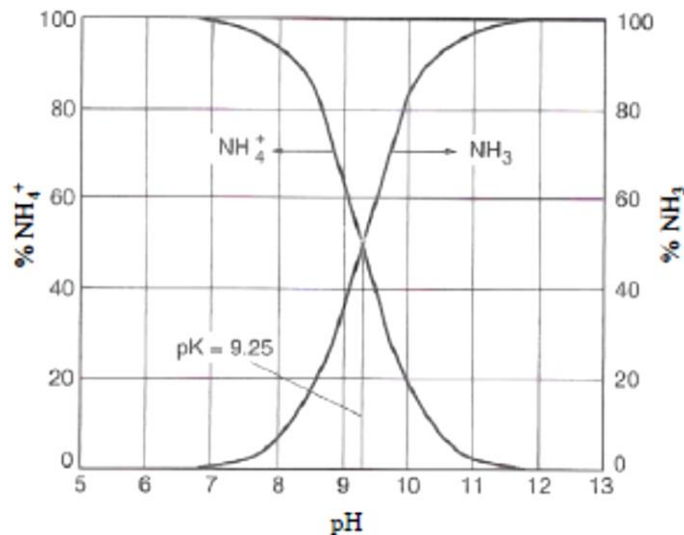


Figura 3.3 - Relação entre amônia livre e ionizada em função do pH
 Fonte: Metcalf & Eddy, 2003

Conforme observado na Figura 3.3, com a elevação do pH da solução, o nitrogênio amoniacal tende a aumentar sua concentração na forma de amônia livre (forma tóxica). À medida que diminui a acidez da solução, aumenta a concentração da forma dissolvida do nitrogênio amoniacal (íons amônio). No ponto de pH em torno de 9,25, tem-se o ponto de equilíbrio onde as formas dissolvida e tóxica se encontram com 50% da sua concentração.

O nitrogênio total é formado por:

$$\text{N-total} = \text{N-orgânico} + \text{N-amônia (NH}_4^+) + \text{N-nitrito (NO}_2^-) + \text{N-nitrato (NO}_3^-) \quad \text{Eq.3.5}$$

$$\text{NTK} = \text{N-amônia} + \text{N-orgânico (predominante nos esgotos domésticos brutos)} \quad \text{Eq. 3.6}$$

Por sua vez, o nitrogênio orgânico é rapidamente desaminado a uréia e esta é hidrolisada a amônia pela enzima urease. Este processo bioquímico é evidente em esgotos tanto de origem doméstica quanto industrial, apesar da ocorrência dos compostos nitrogenados em concentrações variadas.

As reações, das quais participam as espécies inorgânicas de nitrogênio, envolvem um sistema enzimático bastante variado. Entre estas enzimas estão a nitrogenase (que leva à formação do íon amônio), a amônia monoxigenase (que produz hidroxilamina) e nitrito redutase e óxido redutase, que formam óxido nitroso e nitrogênio gasoso, respectivamente (YE & THOMAS, 2001).

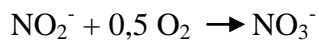
Diversas pesquisas no meio científico a respeito de remoção de nitrogênio estão voltadas para melhorar a eficiência e redução de custos, otimizando estratégias de tratamento disponíveis. Segundo Fux *et al.* (2002), a eliminação química de amônio por precipitação com amônio-fosfato de magnésio ou por “*stripping*” é viável, mas gera custos mais elevados do que os processos de tratamento biológicos.

3.1.1 Nitrificação e desnitrificação

No processo de nitrificação, bactérias aeróbias oxidadoras de amônia oxidam o nitrogênio da amônia a nitrato via nitrito ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$). É um processo de duplo estágio, sendo catalisado por microorganismos aeróbios quimioautotróficos e bactérias nitrito oxidante. Bactérias oxidadoras de amônia são geralmente consideradas quimiolitoautotróficas, para os quais o gás carbônico é a principal fonte de carbono. A energia é obtida através da oxidação de um substrato inorgânico, como amônia e suas formas mineralizadas. Os gêneros mais conhecidos no primeiro estágio são as *Nitrosomonas* e *Nitrosospira* (conhecidas como oxidadoras de amônia pertencentes da subclasse β -Proteobacteria) e as *Nitrosococcus* (pertencentes da subclasse γ -Proteobacteria), apesar de haver ainda obscuridade em relação ao nicho ecológico e posição filogenética. Na etapa de conversão do nitrito a nitrato, os microorganismos envolvidos são *Nitrobacter* (SCHMIDT *et al.*, 2003).

A mais importante característica da bactéria nitrificante litotrófica é a geração de energia via oxidação da amônia a nitrito e oxidação do nitrito a nitrato, conforme as equações abaixo:





Eq.3.8

Segundo Schmidt *et al.* (2003), durante muito tempo pensava-se que a oxidação da amônia e nitrito por nitrificantes quimiolitotóficas estava restrita a ambientes aeróbios. Porém estudos recentes demonstraram um novo caminho metabólico de oxidação anaeróbia da amônia por bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia (ANAMMOX) e observaram também a existência de um metabolismo anóxico realizados por *Nitrosomonas* e *Nitrospira*. Estes resultados revelam um complexo e diferenciado papel dos óxidos de nitrogênio (NO e NO₂) no metabolismo das oxidadoras de amônia.

Algumas bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (pertencentes à subclasse β das Proteobactérias), como as *Nitrosomonas eutropha*, exercem também esta atividade oxidadora anaeróbia de amônia, a qual usa o dióxido de nitrogênio como acceptor de elétrons (SCHMIDT & BOCK, 1997; SCHMIDT *et al.* 2002). Estas bactérias aeróbias são encontradas na oxidação anaeróbia da amônia para redução de nitrito a dióxido de nitrogênio, com a formação de NO e nitrito.

O estudo mostrou claramente a importância de se distinguir entre oxidação de amônia dependente de nitrito (NO₂⁻) e dependente de oxigênio (O₂). A Figura 3.4, a seguir, apresenta um modelo hipotético proposto por Schimidt *et al.* (2002), da oxidação anaeróbia da amônia por *Nitrosomonas* dependente de nitrito (NO₂⁻).

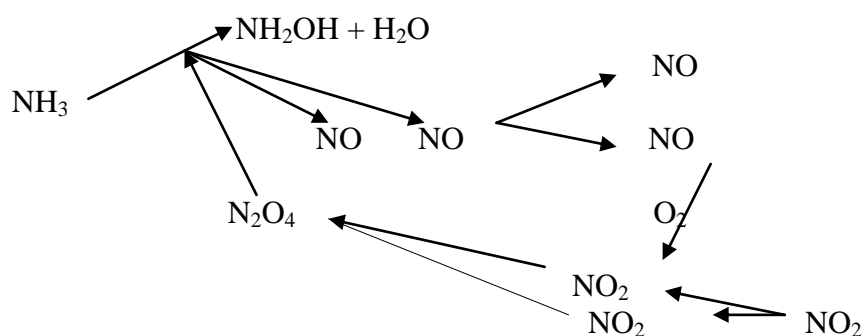


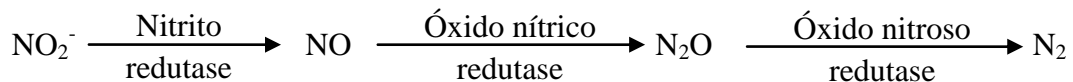
Figura 3.4 - Ciclo do NO_x - modelo hipotético da oxidação anaeróbia da amônia por *Nitrosomonas* dependente do nitrito

Fonte: Adaptado de Schimidt *et al.*, 2002

No modelo hipotético da oxidação da amônia incluem o papel dos óxidos de nitrogênio, conforme detalhado na Figura 3.4. Oxidação anaeróbia da amônia é dependente da presença do N₂O₄ como agente oxidante. NO é produzido em quantidades estequiométricas. Apenas quando NO₂ está disponível sob condições anóxicas, amônia é

oxidada e a hidroxilamina ocorre como intermediário enquanto NO é formado como produto final. Hidroxilamina é adicionalmente oxidada a nitrito.

No processo heterotrófico de desnitrificação há redução do nitrato (ou nitrito) a nitrogênio gasoso ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$), com consequente ganho de elétrons. Segundo Bock & Wagner (2006), trata-se de uma respiração anaeróbia onde o nitrato (NO_3^-) serve como acceptor final de elétron. Nitrato é reduzido a óxido nítrico (NO), o qual é reduzido a óxido nitroso (N_2O) e a dinitrogênio gasoso (N_2), conforme a sequência abaixo:



O dinitrogênio é o principal produto final da desnitrificação, enquanto gases nitrosos como o óxido nítrico e óxido nitroso ocorrem como intermediários e em menores concentrações (SCHMIDT *et al.*, 2003).

Este tipo de respiração anaeróbia pode ser realizada por uma variedade de microorganismos heterotróficos filogeneticamente diferentes. Com a oxidação da amônia a nitrato, bactérias nitrificantes produzem o NO_3^- , com seu elétron acceptor para subsequente desnitrificação em sistemas naturais e projetados. Os microorganismos envolvidos na desnitrificação são aeróbios autotróficos ou heterotróficos que podem passar a realizar respiração anaeróbia quando o nitrato é usado como acceptor de elétrons; neste caso o O_2 é o composto limitante ou encontra-se ausente para que o metabolismo da respiração anaeróbia ocorra (BOCK & WAGNER, 2006).

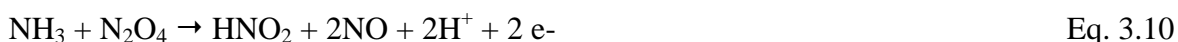
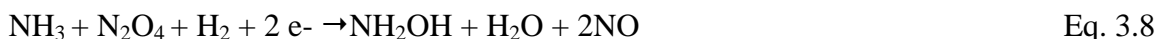
Segundo Sousa & Foresti⁴ apud Sousa (2005), os gêneros de bactérias que realizam a desnitrificação são: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Hiphomicrobium*, *Chromobacterium*, *Halobacterium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Azospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas* e *Klebsiella*. De acordo com Zumft (1992), existem cerca de cento e trinta espécies de bactérias desnitrificantes distribuídas em mais de cinquenta gêneros contribuindo para a reação de desnitrificação.

Na desnitrificação orgânica heterótrofa o carbono orgânico (usualmente acetato e metanol) é o doador de elétrons da respiração anaeróbia. Na desnitrificação inorgânica, por sua vez,

⁴ SOUSA, J. T. & FORESTI, E. Utilização de lodo anaeróbio como fonte externa de carbono no processo de desnitrificação de águas residuárias. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 69-73, 1999.

o sulfeto, hidrogênio e amônia são usados como doadores de elétrons para a respiração anaeróbia.

As equações abaixo mostram a estequiometria proposta neste processo:



O balanço total do nitrogênio para conversão de amônia, tetróxido de nitrogênio, nitrito e óxido nítrico proposto é de 1:1:1:2.

Segundo Mulder *et al.* (1995), o processo de oxidação da amônia é considerado mais difícil porque bactérias nitrificantes autotróficas não competem com bactérias aeróbias heterotróficas pelo oxigênio e outros nutrientes na presença de quantidades suficientes de compostos orgânicos. Adicionalmente, o processo complica-se ainda mais, uma vez que bactérias desnitrificantes necessitam de fornecimento suficiente de doadores de elétrons, usualmente representados pelos compostos orgânicos. Os diferentes requerimentos de nitrificantes e desnitrificantes levaram a um número de combinações em reatores para a remoção de nitrogênio de águas residuárias

3.1.2 O processo não convencional de desnitrificação por *Nitrosomonas*

As bactérias podem utilizar muitos compostos como oxidante respiratório. Um destes compostos é o nitrato. A respiração ocorre via duas rotas dissimilatórias que utiliza o mesmo substrato, mas com diferente produto final. Uma destas rotas, chamada amonificação, é realizada pela redução do nitrato a nitrito e assim a amônia. O segundo caminho da respiração do nitrato é a desnitrificação, na qual o nitrato é reduzido a óxido de nitrogênio, e principalmente gás nitrogênio. Numa primeira etapa o nitrato é reduzido a nitrito e, numa segunda etapa, a gás nitrogênio. O processo é denominado desnitrificação (BITTON, 2005).

Bactéria oxidadora de amônia não apenas catalisa a oxidação aeróbia de amônia, como também apresenta atividade desnitrificante com nitrito como acceptor de elétrons (BOCK & WAGNER, 2006).

Membros do gênero das oxidadoras de amônia Gram negativas, como *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, são organismos litoautotróficos que usam o dióxido de carbono como principal fonte de carbono. Recentemente diversas técnicas moleculares (dentre elas a técnica da PCR) tem sido utilizadas para detecção da presença de bactérias oxidadoras de amônia no ambiente, a partir da amplificação específica do gene estrutural da amônia monooxigenase (*amoA*). Estas ferramentas moleculares tem permitido a detecção de nitrificantes em ambientes anóxicos (SCHMIDT *et al.*, 2002).

Estas ferramentas moleculares tem permitido a detecção de nitrificantes em ambientes anóxicos (SCHMIDT *et al.*, 2002).

Na ausência de oxigênio dissolvido *Nitrosomonas eutropha* e *Nitrosomona europaea* são capazes de realizar desnitrificação anóxica usando hidrogênio molecular ou compostos orgânicos simples como doadores de elétrons e nitrito como acceptor de elétrons (ABELIOVICH & VONSHAK, 1992). Tal estudo sugeriu que estes microorganismos podem seguir uma rota metabólica alternativa em ausência de oxigênio sem realizar nitrificação.

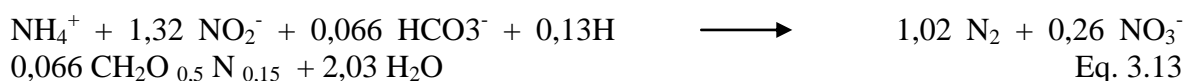
3.2 As bactérias ANAMMOX

Mulder *et al.* (1995) verificaram, em uma planta piloto de desnitrificação de um sistema de tratamento de água residuária em Delft (Holanda), desaparecimento de amônia e de nitrato com concomitante produção de nitrogênio gasoso, obtendo uma taxa máxima de remoção de amônia de $1,2 \text{ mmol. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A partir daí estava descoberto um novo e promissor processo de oxidação anaeróbia da amônia sob condições anóxicas, onde o nitrato foi o acceptor final de elétrons. Tal processo foi denominado e patentado como ANAMMOX (“*Anaerobic Ammonium Oxidation*”).

Em um trabalho anterior realizado por Broda (1977), foi descrita a possibilidade da existência de uma bactéria quimiolitotrófica capaz de oxidar amônia a gás nitrogênio, tendo o nitrato, dióxido de carbono ou oxigênio como oxidante (MULDER *et al.* (1995). Tal estudo mostrou a viabilidade da reação apenas por considerações teóricas.



De acordo com a estequiometria proposta por Strous *et al.* (1998), a taxa teórica de consumo de nitrito/amônio é de 1,32, enquanto a taxa de formação de nitrato e consumo de amônia é de 0,26, conforme a equação Eq.3.13:



Em um dos estudos, Strous *et al.* (1999) quantificaram o crescimento de bactérias ANAMMOX avaliando parâmetros fisiológicos como pH, temperatura e substratos, fornecendo informações importantes sobre as características deste grupo, comparadas com outras bactérias nitrificantes. A Tabela 3.1 resume algumas características fisiológicas importantes do processo de oxidação anaeróbia e aeróbia da amônia resultantes deste estudo.

Tabela 3.1 - Comparação dos parâmetros fisiológicos entre ANAMMOX e nitrificantes

Parâmetro	ANAMMOX	Nitrificação ^a	Unidade
Taxa de consumo aeróbio máximo específico de NH_4^+	0	2-5	g N- NH_4^+ . g proteína-L.dia ⁻¹
Taxa de consumo anaeróbio máximo específico de NH_4^+	1,1	<0,05 ^b	g N- NH_4^+ . g proteína-L.dia ⁻¹
Rendimento da biomassa	0,07	0,1	g proteína.g N- NH_4^+ .L ⁻¹
Energia de ativação	70	70	KJ. mol ⁻¹
Afinidade por amônia	$\leq 10^{-4}$	$\geq 10^{-4}$	g N- NH_4^+ . L ⁻¹
Afinidade por nitrito	$\leq 10^{-4}$	NA ^c	g N- NO_2^- . L ⁻¹
Faixa de temperatura	20-43	≤ 42	°C
Faixa de pH	6,7-8,3	variável	-
Conteúdo de proteína da biomassa	0,6	variável	g proteína.g peso total seco ⁻¹

a - dados obtidos por Wiesman, 1997.

b - conforme descrito por Zart, D., e E. Bock. 1998.

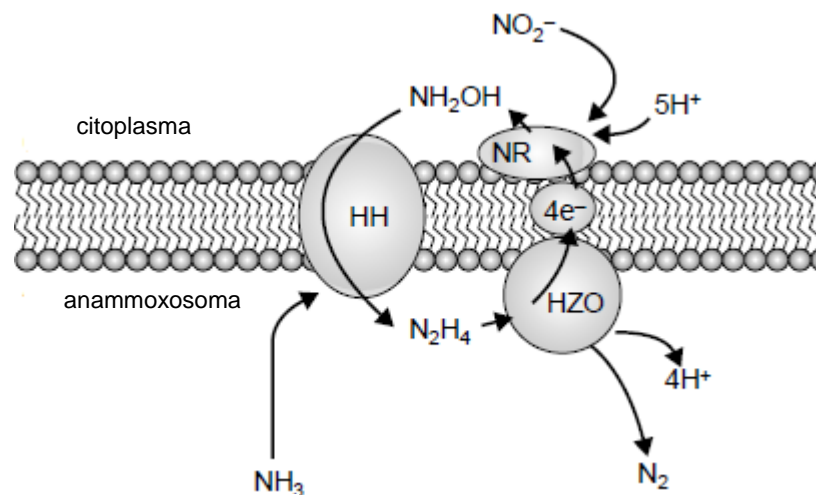
c - NA não aplicável

A Tabela 3.1 mostra alguns parâmetros fisiológicos das bactérias nitrificantes aeróbias, uma vez que se parece com a ANAMMOX sob o ponto de vista fisiológico. Tal estudo foi importante, pois ambas possuem características específicas como: ANAMMOX não tem atividade aeróbia e a atividade anaeróbia das nitrificantes aeróbias é apenas 5% do total da atividade das ANAMMOX. No entanto, o rendimento da biomassa, faixa de temperatura e energia de ativação parecem aproximadamente os mesmos para estes organismos aeróbios e anaeróbios. Já a conversão máxima de substrato específico é muito menor para as ANAMMOX e afinidade por amônia se diferem. Associa-se este fator ao rendimento muito lento da biomassa, uma vez que foi observado um tempo de duplicação de aproximadamente 11 dias, sob ótimas condições das ANAMMOX.

Segundo Jetten *et al.*, (2001), processos como ANAMMOX e SHARON (processo parcial de nitrificação) têm redução de 60% de requerimento de oxigênio para remoção de nitrogênio, pois não requer carbono orgânico, diminui a geração de lodo excedente, além de reduzir fortemente a geração na emissão de CO₂, sendo algumas vantagens destes processos.

Segundo Egli *et al.*(2001), é necessária a identificação de mais bactérias capazes de oxidar a amônia anaerobiamente, uma vez que os organismos ANAMMOX já conhecidos tem sido extremamente difíceis de cultivar em cultura pura.

A partir do sistema descoberto por Mulder *et al.* (1995), Jetten *et al.* (2001) enriqueceram uma comunidade microbiológica a qual foi identificada como *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Através de microscopia eletrônica da ultraestrutura desta cultura enriquecida, foi possível identificar compartimentos presentes dentro do citoplasma, que após estudos, foi denominado anammoxossoma, local este onde supostamente ocorre a reação ANAMMOX, devido a presença exclusiva da enzima hidroxilamina oxidoreductase. A Figura 3.6 ilustra a pesquisa realizada na tentativa de elucidação do processo metabólico da reação ANAMMOX.



Fonte: Jetten *et al.* 2001

Figura 3.6 - Mecanismo de oxidação anaeróbica da amônia. NR é a enzima nitrito redutase, HH é hidroxilamina oxidoreductase, HZO é a enzima hidrazina desidrogenase

O possível caminho metabólico apresentado na Figura 3.6 foi investigado a partir de experimentos com ^{15}N marcados. Deste experimento mostrou-se que o nitrito foi reduzido a hidroxilamina, a qual reage com o elétron doador do íon amônio, levando à produção de gás nitrogênio. O acúmulo de hidrazina observado durante o experimento indicou que este composto é intermediário no processo. A ocorrência de hidrazina livre é considerado um fato raro se não único no metabolismo microbiológico do nitrogênio.

A identificação de gêneros de bactérias com atividade ANAMMOX foi realizado por Schmid *et al.* (2000) em Stuttgart na Alemanha, através de técnica de biologia molecular em biofilmes de reatores tipo biodiscos rotatórios, tendo sido denominado *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*. Egli *et al.* (2001) enriqueceram microorganismos ANAMMOX a partir de biomassa de um reator usado para o tratamento de efluente rico em amônia, obtendo cerca de 88% de população ANAMMOX. A identificação da cultura enriquecida, através do seqüenciamento do DNAr 16S e comparação com sequencias de organismos ANAMMOX conhecidos, revelou que esta apresentava 90% de similaridade com *Brocadia anammoxidans* e 98,9 % de similaridade com *Kuenenia stuttgartiensis*.

Diversas pesquisas se dedicam à identificação de outros gêneros de bactérias com atividade ANAMMOX, sendo denominados provisoriamente: *Brocadia fulgida*, *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus anammoxoglobus propionicus* e *Candidatus Jettenia asiatica* (KARTAL *et al.*, 2004; KARTAL *et al.*, 2007; QUAN *et al.*, 2008).

O processo ANAMMOX, segundo Dapena-Mora *et al.*, (2004), pode ser limitado pela disponibilidade de biomassa ANAMMOX, uma vez que o isolamento e enriquecimento desta na mistura de bactérias requer a otimização das condições que favorecem o processo, enquanto limita o crescimento dos demais tipos de população microbiana. Segundo os autores, durante o tratamento anaeróbio de águas residuárias ricas em proteína, são gerados efluentes de digestores contendo largas quantidades de amônia (em concentrações de N-NH_4^+ acima de $2,0\text{g.L}^{-1}$) e baixos conteúdos de demanda química de oxigênio (DQO) biodegradável. A taxa de carbono orgânico-nitrogênio destes efluentes não é apropriada para remover o nitrogênio pelo processo de nitrificação/desnitrificação, implicando em adição externa de matéria orgânica e aumento de custos. O processo ANAMMOX poderia ser combinado com um prévio estágio parcial, onde 50% de amônia seria oxidada a nitrito (HELLINGA⁵ apud DAPENA-MORA, 2004). Neste sentido, a totalidade da remoção autotrófica de nitrogênio é alcançada. Cada combinação poderia gerar uma redução de custos comparada ao sistema tradicional, pois menos de 40% de oxigênio é requerido e a adição de matéria orgânica não é necessária. Outra vantagem é a baixa quantidade de lodo excedente que também poderia levar à redução nos custos operacionais. (JETTEN *et al.*, 1997).

Este grupo de organismos está sendo detectado em diversos ecossistemas, variando desde plantas de tratamento de águas residuárias ao gelo ártico, segundo Kartal *et al.* (2007). Assim, a atividade ANAMMOX tem sido localizada nos ecossistemas não artificiais, em sedimentos da costa da Groelândia, estuários da Dinamarca e Austrália, no mar Negro e Uganda, conforme Kuypers⁶ apud Kartal *et al.* (2007), Jetten *et al.* (2004).

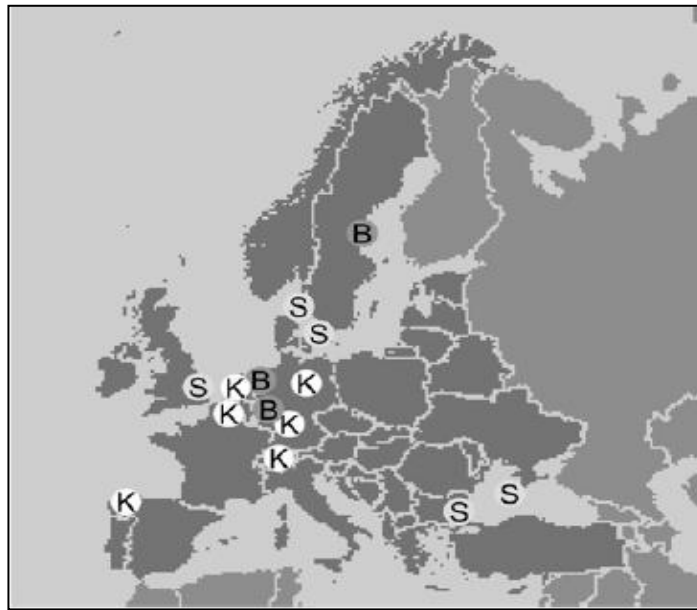
Devido à evidência da presença de amônia e nitrito em flocos de lodo ativado nitrificante, organismos ANAMMOX podem criar *habitat* em ecossistemas artificiais como plantas de tratamento de águas residuárias (JETTEN *et al.*, 1999). Este fato é importante, pois relata a viabilidade da combinação de sistemas de tratamento de águas residuárias e remoção de nitrogênio. A abundância de suplemento de amônia (via afluente de águas residuárias brutas), em combinação com a disponibilidade de limitação de oxigênio, poderia prover

⁵HELLINGA, C.; SCHELLEN, A.A.J.C., MULDER, J.W.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J.. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci. Technol.* v.37, p.135-142, 1998.

⁶KUYPERS *et al.* Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* v. 422, p. 608-611, 2003.

uma condição na qual amônia e nitrito coexistem como substratos para a ocorrência da oxidação anaeróbia da amônia.

Diversos sistemas naturais e artificiais revelaram a presença de populações significativas da bactéria, detectadas através de sondas e iniciadores específicos para este grupo, usados respectivamente, nas técnicas de hibridação *in situ* e da *PCR*. O mapa da Figura 3.7 mostra os locais onde foram identificados apenas os gêneros *Brocadia* (incluindo *B. anammoxidans*), *Kuenenia* (incluindo *K. stuttgartiensis*) e *Scalindua* (incluindo *wagneri* e *brodae*).



Legenda: **B**= gênero *Brocadia*; **K**= gênero *Kuenenia*; **S**= gênero *Scalindua*

Fonte: Jetten *et al.*, 2005

Figura 3.7 - Distribuição geográfica da bactéria ANAMMOX na Europa

Em 2002, o primeiro reator em escala plena foi colocado em operação em uma planta de tratamento de lodo em Rotterdam, Holanda. Este reator foi alimentado com o líquido de lodo parcialmente nitrificado e projetado em colaboração com Delft University of Technology Paques (VAN DONGEN *et al.* 2001).

Vários tipos de reatores têm sido empregados nas instalações de plantas piloto e em escala plena, onde o processo ANAMMOX é aplicado. A Tabela 3.2 apresenta dados do tipo de reator, local da instalação e algumas características funcionais do processo.

Tabela 3.2 – Dados de conversão de N dos reatores em planta piloto e escala real operados com processo ANAMMOX

Localização	Tipo de reator	Volume (m ³)	Conversão máxima de N (Kg N.m ⁻³ .d ⁻¹)	Organismo	Limitação	Referência
Rotterdam (Holanda)	Reator de lodo granular	70	10(20) ^a	<i>Brocadia</i>	Alimentado com nitrito	Van der Star, 2007
Lichtenvoorde (Holanda)	Reator de lodo granular	100	1	<i>Kueneria</i>	Alimentado com nitrito	Abma & Haarhuis <i>apud</i> Van der Star, 2007
Hattingen (Alemanha)	Leito com movimento	67	1	Nd ^b	-	Thole <i>et al.</i> , 2005
Mie (Japão)	Reator de lodo granular	58	3	Nd ^b	Alimentado com amônia	Abma & Tokutom <i>apud</i> Van der Star, 2007
Balk (Holanda)	Reator de lodo granular	5	4	<i>Kueneria</i>	Alimentado com nitrito	Van der Star, 2007
Estocolmo (Suécia)	Leito com movimento	2	0,1	<i>Brocadia</i>	Alimentado com nitrito	Gut <i>et al.</i> , 2006
Zurick (Suíça)	SBR	2,5	2	Nd ^b	Alimentado com nitrito	Fux <i>et al.</i> , 2002

(Fonte: modificado de Van der Star *et al.*, 2007.)

a - conversão estimada no menor compartimento

b - Nd = não detectado

Segundo os dados da Tabela 3.2, a conversão volumétrica nestes reatores foi marcadamente menor que no reator de Rotterdam, e isto foi geralmente limitado pela disponibilidade de substrato. Todo reator limitado pelo substrato é, por definição, projetado em excesso, o que não permite comparar tipos de reatores baseado nestas conversões.

3.3 Trabalhos que enriqueceram bactérias ANAMMOX em reatores em batelada

Desde a descoberta das bactérias oxidadoras anaeróbias de amônia por Mulder *et al.* (1995), diversos estudos e experimentos vem sendo realizados para melhor entendimento da reação, filogenia, bioquímica, distribuição geográfica e técnicas de enriquecimento, além de identificação destas bactérias.

Assim, dentre os estudos realizados, foram utilizadas técnicas de enriquecimento diferenciadas no cultivo das ANAMMOX. Dentre os sistemas de operação dos reatores, utilizou-se o sistema em batelada, objetivando tanto o enriquecimento quanto a avaliação da atividade ANAMMOX de culturas já enriquecidas (ou supostamente enriquecidas).

A Tabela 3.3 apresenta alguns destes procedimentos (e trabalhos), com detalhamento da característica e conclusão do experimento.

Sendo assim, observa-se que o enriquecimento de bactérias ANAMMOX, em alguns casos, foi viável pelo sistema em batelada usando diferentes tipos de inóculo. Não obstante, o tempo de enriquecimento (ou o tempo necessário para se detectar inicialmente atividade ANAMMOX) foi muito longo (de 150, 200 a 360 dias, conforme Tsushima *et al.* (2007) e Sanchez-Melsió *et al.* (2009), quando comparado ao enriquecimento em sistema contínuo (apresentado a seguir). Em alguns casos, como verificado por Tsushima *et al.* (2007), alguns lodos nunca apresentaram atividade ANAMMOX. As condições do experimento como pH, temperatura e tipo de meio de cultura usado não tiveram variação significativa entre as pesquisas, exceto naqueles estudos onde o objetivo do enriquecimento era o de conhecer a limitação da biomassa quanto aos parâmetros de operação e substrato.

Em experimentos não utilizou-se apenas inóculos já enriquecidos, isto é, com atividade ANAMMOX, mas também lodo que apresentava prévia remoção de compostos nitrogenados e/ou sedimentos provenientes de *habitats* com características ambientais viáveis para a presença dessas bactérias. Os resultados mostraram, na maioria, o sucesso o enriquecimento da cultura ANAMMOX, confirmando a viabilidade deste procedimento dentro das condições de limitação do processo.

Tabela 3.3 – Experimentos de enriquecimento de ANAMMOX em reatores batelada

Referência	Características do experimento	Conclusões do experimento
Egli <i>et al.</i> (2001)	<ul style="list-style-type: none"> - lodo de origem: material de biofilme de reator RBC em Kolliken com 40-70% de eficiência de remoção de nitrato, rico em amônia e baixa concentração de carbono; - primeiro enriqueceu cultura em frascos contendo 1 litro de meio mineral e 0,5 g de biofilme proveniente do reator de Kolliken; - a partir desta cultura enriquecida utilizou-se frascos contendo 43 mL de meio e 2 mL da suspensão de bactéria ANAMMOX enriquecida; - houve adição de hidroxilamina e hidrazina nos reatores. 	<ul style="list-style-type: none"> - cultura enriquecida continha 90% organismos ANAMMOX; - cultura enriquecida era similar à <i>Kuenenia stuttgartiensis</i> usando sondas AMX820 e Pla46rc (planctomicetos) - não houve reação de desnitrificação clássica na incubação anóxica
Toh <i>et al.</i> (2002)	<ul style="list-style-type: none"> - cultura em batelada usando meio autotrófico segundo VAN de GRAAF (1996) e inóculo de biomassa (lodo de tanque secundário anaeróbio de lodo mesofílico de uma planta de tratamento municipal em Sydney e lodo ativado inoculado com 50% de lodo ativado mesofílico de água residuária proveniente de indústria de forno de coque e 50% de biomassa de um reator enriquecido com atividade ANAMMOX após 4 meses de seleção e enriquecimento). 	<ul style="list-style-type: none"> - após 10 semanas houve estabilização do consórcio na remoção de N, passando a operar em modo contínuo
Tal <i>et al.</i> (2005)	<ul style="list-style-type: none"> - inóculo usado foi o sedimento coletado a 9,1 m de profundidade do porto de Harbor em Baltimore; - semeou 5 g de sedimento em 150 mL de meio ANAMMOX específico - para avaliar a atividade ANAMMOX, foram inoculados reatores com 150 mL de meio e 1 g com sedimento com N marcado, e amônia e nitrito não marcados. 	<ul style="list-style-type: none"> - foram identificados organismos com atividade ANAMMOX bem como a presença de <i>Nitrosomonas</i>
Tsushima <i>et al.</i> (2007)	<ul style="list-style-type: none"> - enriquecimento de 15 lodos diferentes em reatores semi batelada; - usou 25 mL de lodo em 500 mL de meio autotrófico; - lodo de origem proveniente de reator RBC com eficiência de 25% de perda de nitrogênio e trocas freqüentes de meio; - quando a cultura enriquecida estava com 6 meses de operação, foram feitos testes com culturas em batelada e N marcados. 	<ul style="list-style-type: none"> - dos 15 lodos testados, 12 apresentaram reação ANAMOX; - a partir do 380º dia, a atividade foi observada. No 410º dia de operação a taxa de remoção chegou a 292µmol/l.h; - a estequiometria da reação foi de 1:1,38:0,29; - análise FISH com provas AMX 820 e PLA46. A quantificação das ANAMMOX (com Amx820), após 380 e 410 dias de enriquecimento, revelou uma concentração de 1,2x10⁶ e 3,0x10⁷ células/mL, respectivamente

3.4 Trabalhos que enriqueceram bactérias ANAMMOX em reatores em batelada sequencial ou reatores de leito fixo (sistema contínuo)

Além dos experimentos realizados em modo batelada, vários experimentos foram feitos em reatores em batelada sequencial ou reator de leito fixo, onde havia a troca constante do meio de cultura, determinado pelo tempo de detenção hidráulica de cada um.

Algumas referências de experimentos e os detalhes do estudo estão resumidos na Tabela 3.4

Segundo STROUS *et al.* (1997), o enriquecimento de cultura ANAMMOX é favorecido pelo sistema contínuo, apesar da existência do enriquecimento em reatores operados em modo batelada (conforme referências apresentados na Tabela 3.3).

Pela Tabela 3.4 é possível observar a variedade de experimentos usados para enriquecimento de ANAMMOX operados em modo sequencial em batelada, tendo sido inoculadas: cultura já enriquecida, lodo proveniente de efluente com altas concentrações de fenol, mistura de lodos provenientes de plantas de tratamento municipal e lodo proveniente de reator anaeróbio. Percebe-se nos experimentos a presença da atividade ANAMMOX em todos os reatores, independente da ocorrência ou não de outra flora bacteriana.

Tabela 3.4- Experimentos de enriquecimento de ANAMMOX operados em modo sequencial em batelada

Referência	Características do experimento	Conclusões do experimento
Strous <i>et al.</i> (1997)	<ul style="list-style-type: none"> - inoculou cultura enriquecida do reator proveniente do experimento de Mulder (1995), sendo inoculados 0,86g de sólidos suspensos voláteis em meio autotrófico segundo VAN de GRAAF (1996); - reator foi operado com intermitência de fases aeróbia (2h) e anaeróbia (2h) e taxa de diluição hidráulica de 0,010/h; - enriqueceu ANAMMOX do reator SBR sob condições de batelada para avaliar se estas bactérias poderiam ser aeróbias facultativas. 	<ul style="list-style-type: none"> - houve crescimento de <i>Nitrosomonas</i>; - observou-se a inibição reversível da atividade ANAMMOX após etapa aeróbia; - concluiu-se impossibilidade de desenvolvimento de flora nitrificante aeróbia sob condições de alternância de aeração
Toh <i>et al.</i> (2002)	<ul style="list-style-type: none"> - adicionou-se fenol passo a passo nas concentrações de 50 a 330 mg.L⁻¹; - a cultura recebeu cloranfenicol na concentração final de 100 mg.L⁻¹ para inibir a flora desnitrificante heterotrófica presente após a adição do fenol 	<ul style="list-style-type: none"> - após 15 meses de enriquecimento/aclimatação do consórcio a altas concentrações de fenol, a biomassa no reator passou a ter uma coloração rosada - o consumo foi de 62 mg N-NH₄⁺ por dia - o reator com fenol apresentou maior atividade que o reator sem adição de fenol
Dapena-Mora <i>et al.</i> (2004)	<ul style="list-style-type: none"> - reator inoculado de uma mistura de lodos de plantas de tratamento municipal na Espanha em SBR e meio autotrófico segundo VAN de GRAAF (1996); - inoculação de 4g de sólidos suspensos voláteis por litro de meio - reator com volume de 1litro e com TDH de 0,62 dia; - estratégia operacional consistiu no aumento dos teores de amônia e nitrito sempre que havia depleção total 	<ul style="list-style-type: none"> - após 100 dias de incubação houve consumo concomitante de amônia e nitrito; -relata a permanência de heterotróficas no sistema após a confirmação da atividade ANAMMOX no reator (crescimento críptico), pois se alimentava da lise de produtos e substratos biodegradáveis provenientes do afluente. Relata a importância da presença desta flora para consumo de oxigênio no reator. - eficiência de remoção de 82%
Chamchoi & Nitorisavut (2007)	<ul style="list-style-type: none"> - lodo proveniente de reator anaeróbio UASB. Lodo ativado e lodo de digestor anaeróbio foram incubados em 3 conjuntos de SBR em meio autotrófico segundo VAN de GRAAF (1996), sendo S1 (lodo UASB), S2 (lodo ativado) e S3 (lodo do digestor anaeróbio); - foi usada uma concentração inicial de 1,5 g.L⁻¹ de sólidos suspensos; - concentrações afluentes iniciais de amônia: S= 47,4, S2= 45,7, S3= 44,7 mg N-NH₄⁺.L⁻¹; - concentrações afluentes de nitrito: S1= 55,9, S2= 54,4, S3= 53,9 mg N-NO₂⁻.L⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - após 3 meses de operação foi observada atividade anammox em todos os reatores; - estequiometrias obtidas: S1= 1:1,5, S2= 1:1,53 e S3= 1:1,5; - estequiometria da formação de nitrito: média de 1:0,04; - Os reatores apresentaram 80% de eficiência de remoção de N.

3.5 A aplicação do processo ANAMMOX e variantes do processo

A descoberta do processo biológico de remoção da amônia por oxidação anaeróbia tornou-se uma nova possibilidade de tratamento de águas residuárias para remoção do nitrogênio.

Segundo Schmidt *et al.* (2003), o paradigma onde apenas o caminho para a conversão biológica da amônia em águas residuárias a gás nitrogênio necessita da completa oxidação do nitrato, seguido pela desnitrificação heterotrófica, tornou-se obsoleto.

Assim, a aplicação de novas possibilidades microbiológicas para remoção de nitrogênio faz parte de diversos estudos recentes. A Tabela 3.5 compara as diferentes características operacionais de sistemas biológicos para remoção de nitrogênio de águas residuárias, como o sistema convencional nitrificação/desnitrificação, NO_x , OLAND, SHARON, ANAMMOX e CANON. Ressalta-se nos dados resumidos na Tabela 3.5 a alta eficiência de remoção de N, comum a todos os processos apresentados, além do baixo investimento pelo processo ANAMMOX em relação aos demais.

No futuro, a combinação de diferentes grupos de microorganismos que convertem o nitrogênio e a otimização do manejo dos processos (adaptação de acordo com a composição da água residuária; desenho da planta de tratamento; temperatura; suprimento de oxigênio e NO_x) vai melhorar a remoção de nitrogênio (SCHIMIDT *et al.* 2003).

Tabela 3.5 – Características operacionais de sistemas biológicos para remoção de nitrogênio em águas residuárias

	Nitrificação/desnitrificação convencional	NO _x	OLAND	SHARON	ANAMMOX	CANON
Oxidadoras aeróbias de amônia	muitas	<i>N. eutropha</i>	desconhecido	<i>N. eutropha</i>	ausente	<i>N. eutropha</i>
Oxidadoras aeróbias de nitrito	muitas	ausente	desconhecido	ausente	ausente	ausente
Oxidadoras anaeróbias de amônia	ausente	ausente	desconhecido	ausente	<i>B. anammoxidans</i> <i>K. stuttgartiensis</i>	<i>B. anammoxidans</i> <i>K. stuttgartiensis</i>
Suspensão ou biofilme	ambos	suspensão	biofilmes	suspensão	biofilmes/suspensão	biofilmes
Eficiência de remoção de N	95%	95%	85%	90%	90%	90%
Complexidade do processo	compartimentos óxicos e anóxicos separados; necessita adição de metanol	compartimentos óxicos e anóxicos separados; necessita adição de metanol	aeração precisa ser sintonizada com carga de amônia	compartimentos óxicos e anóxicos separados; necessita adição de metanol	necessita nitrificação parcial precedente	aeração precisa ser sintonizada com carga de amônia
Status da aplicação	estabelecido	planta piloto	laboratório	2 plantas em escala real	Planta em escala real desde 2002	laboratório
Custos do investimento	médio	médio	médio	médio	baixo	médio
Custos operacionais	alto	baixo	desconhecido	baixo	muito baixo	baixo

(Fonte: Schmidt *et al.*, 2003)

3.6 Outros trabalhos que enriqueceram ANAMMOX

O primeiro trabalho a fazer enriquecimento de bactérias ANAMMOX foi o de Van de Graaf *et al.* (1996), utilizando lodo de reator desnitrificante que apresentava perda de amônia (MULDER *et al.*, 1995). A biomassa foi enriquecida em reator de leito fluidizado, com meio mineral autotrófico contendo amônio e nitrito como doador e aceptor de elétrons, respectivamente. A concentração de oxigênio foi mantida abaixo dos níveis de detecção ($<1\mu\text{M}$) para prevenir efeitos inibitórios. Após enriquecimento da biomassa ANAMMOX, a velocidade de remoção de nitrogênio aumentou de $0,4 \text{ Kg.N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no lodo original para $2,4 \text{ Kg.N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. O tipo de microrganismo dominante no enriquecimento foram bactérias Gram-negativas com morfologia não usual apresentando coloração avermelhada. O método do Número Mais Provável (NMP) revelou a presença de nitrificantes aeróbias no lodo, mas o número permaneceu constante e em torno de $9 (\pm 5) \times 10^3 \text{ células (mgSV)}^{-1}$ de oxidadoras de amônia e $1 (\pm 0,9) \times 10^3 \text{ (mg.SV)}^{-1}$ de oxidadoras de nitrito. Comparado a uma cultura pura de *Nitrosomonas europaea* com $9 \times 10^9 \text{ células (mgSV)}^{-1}$, o número de nitrificantes foi considerado muito pequeno para ter tido influência representativa no processo (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996).

O segundo trabalho foi o de Strous *et al.*, (1998), que utilizaram dois reatores em batelada sequencial (RBS) (de 2L e 15L), aplicando o lodo do reator de leito fluidizado (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996) como inóculo para o enriquecimento das ANAMMOX. No início e por cerca de 100 dias de experimento, alimentaram os SBR com 5mM de NH_4^+ e 5mM de NO_2^- . Após esse tempo as concentrações de amônio e de nitrito foram aumentadas gradualmente, chegando a 30 mM. Esse trabalho é muito importante, pois os autores operaram o RBS por mais de 1 ano, fizeram vários cálculos de balanço de massa (de carbono e nitrogênio) e com isso calcularam a estequiometria da reação ANAMMOX, bem como determinaram parâmetros de crescimento desta bactéria (tempo de duplicação de 11 dias, etc). Além disso, indicaram o RBS como sendo a melhor forma de se enriquecer bactérias de crescimento muito lento, como as ANAMMOX, devido aos seguintes aspectos: (i) operação confiável do sistema por longos períodos; (ii) eficiente retenção da biomassa (no período de sedimentação do lodo), levando a 90% de retenção da biomassa em crescimento; (iii) distribuição homogênea dos substratos e agregados o que tornou representativa as amostragens e os experimentos de desempenho do sistema; (iv) condições estáveis foram obtidas permitindo a realização dos cálculos de balanço de massa sob condições definidas; (v) os resultados obtidos no SBR podem ser traduzidos diretamente para a aplicação prática do

processo ANAMMOX, já que uma retenção confiável da biomassa seria um dos pontos cruciais no momento de se aplicar o processo em escala maior para remover amônia de águas residuárias.

Egli *et al.*, (2001) enriqueceram ANAMMOX a partir de biofilme proveniente de reator com biodiscos tratando água residuária rica em amônia (em Kölliken, Suíça). Fizeram o cultivo em batelada (frascos de 2L), através da técnica de diluição e enriquecimento. Obtiveram ao final de 6 meses, aproximadamente 88% de bactérias ANAMMOX em relação ao total de células no enriquecimento. Através da amplificação e sequenciamento do DNAr 16S verificaram que as ANAMMOX enriquecidas apresentaram 98.9% de similaridade de seqüência do gene DNAr16S com *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, e 90.9% de similaridade com *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Através de ensaios fisiológicos, verificaram que a bactéria ANAMMOX enriquecida catalisava a reação ANAMMOX de maneira similar à descrita para *B. anammoxidans*, porém exibiu maior tolerância a fosfato (maior que 20 mM) e a nitrito (maior que 13 mM), e estava ativa em baixa concentração celular. Além disso, foi verificada atividade ANAMMOX na faixa de pH 6,5 a 9 (com ótimo em pH 8) e a temperatura ótima de crescimento foi de 37°C. Hidroxilamina e hidrazina, que são intermediários da reação ANAMMOX catalisada por *B. anammoxidans*, também foram utilizados pelas ANAMMOX de Kölliken, e aproximadamente 15% do nitrito utilizado durante o crescimento autotrófico foi convertido em nitrato.

Dapena-Mora *et al.*, (2004) fizeram o enriquecimento de bactérias ANAMMOX a partir de lodo de um sistema de tratamento de águas residuárias municipais, utilizando reator em batelada seqüencial (SBR). Após 60 dias começaram a detectar atividade ANAMMOX, pelo consumo de quantidades estequiométricas de NO_2^- e NH_4^+ no sistema. Análises de FISH confirmaram o aumento da concentração de bactérias ANAMMOX ao longo do tempo. A concentração final obtida da biomassa enriquecida foi de 3-3,5 g.SSV.L⁻¹, apresentando atividade ANAMMOX específica de 0,18 g N-NH₄⁺ g.SSV⁻¹.d⁻¹. O reator foi capaz de tratar cargas de nitrogênio de até 1,4 kg N.m⁻³.d⁻¹, atingindo 82% de eficiência de remoção. A partida e operação do reator SBR ANAMMOX foi modelada com o modelo para lodos ativados “nr1”, adaptado para ANAMMOX. As simulações predizeram muito bem os dados experimentais em relação às concentrações dos compostos nitrogenados e podem ser usadas para estimar a evolução da biomassa ANAMMOX e de heterotróficas no reator. As simulações revelaram que as heterotróficas permaneceram no sistema após a partida do reator e podem proteger os microrganismos ANAMMOX do efeito negativo do oxigênio.

Third *et al.*, (2005) enriqueceram bactérias ANAMMOX a partir de lodo proveniente de sistema de lodos ativados em RBS. Obtiveram atividade ANAMMOX e biomassa suficiente em 14 semanas de enriquecimento. O enriquecimento nesse curto espaço de tempo (comparado com 6 a 8 meses de outros trabalhos) deveu-se à adição de hidrazina e hidroxilamina, que são intermediários do processo. Os autores verificaram que a atividade máxima ANAMMOX foi $0,26 \text{ mM N-NH}_4^+ (\text{g biomassa})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,58 \text{ Kg N-total m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$). Análises qualitativas através da técnica de FISH confirmaram que as bactérias enriquecidas eram ANAMMOX pertencentes à ordem *Planctomicetales*, e em princípio filogeneticamente relacionadas à *B. anammoxidans*. Entretanto, existiram algumas diferenças em sítios alvos de sondas mais específicas, significando que pode se tratar de uma espécie nova de ANAMMOX. Pequena quantidade de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (nitrificantes) (10% v/v) foram inoculadas no reator ANAMMOX para iniciar o processo CANON quimiostato. A cultura do quimiostato esteve sempre sob condições limitantes de oxigênio e nenhuma fonte de carbono foi adicionada. O reator CANON foi operado como um sistema aerado intermitente com 20 minutos de aerobiose e 30 minutos de anaerobiose, durante os quais a oxidação aeróbia e anaeróbia do amônio foi realizada de modo seqüencial, respectivamente. O processo ANAMMOX não foi inibido pela intermitente e repetida exposição ao oxigênio, permitindo a remoção autotrófica completa do amônio ($0,08 \text{ Kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) por longo período de tempo.

Kieling (2004) estudou a remoção biológica de nitrogênio em reatores batelada sequencial em (SBR) inoculados com lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico, sob condições anóxicas, bem como acompanhou o desenvolvimento das populações microbianas. O lodo nitrificante foi proveniente de um sistema de lodos ativados para tratamento de esgoto doméstico. Este foi adaptado por 130 dias em meio autotrófico nitrificante (aeróbio) e posteriormente utilizado como inoculo em dois reatores SBR (RI e R II). O reator RI, após ser submetido à lavagem celular inicial, e o reator RII foram operados com retenção de células, sendo aplicado um TDH de 5 dias. Ambos os reatores foram alimentados com meio autotrófico contendo amônio e nitrito e mantidos sob condições anóxicas por 225 dias. A remoção biológica de nitrogênio no período de estabilidade (150 a 225 dias) foi de 30-40% para RI e em torno de 20% para RII. Apesar de RI apresentar menor concentração celular, apresentou eficiência de remoção específica média de $25 \text{ mg N} \cdot (\text{gSST})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ a partir de 150 dias, muito superior ao RII ($5 \text{ mg N} \cdot (\text{g.SST})^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). No reator RI, a análise por FISH detectou a presença de ANAMMOX evidenciando um enriquecimento do lodo nesta biomassa a partir de lodo nitrificante de um sistema de lodos ativados. Também foi verificado um

enriquecimento de *Nitrosomonas* em relação à *Nitrobacter* em ambos os reatores, quando comparado com o lodo original.

Vanotti *et al.* (2005a) verificaram a presença de bactérias ANAMMOX em sistema piloto que promovia a nitrificação de um efluente de lagoa anaeróbia em uma fazenda de suínos da Carolina do Norte, EUA. Utilizaram esse lodo para fazer o enriquecimento dessas bactérias em um bioreator operado sob fluxo contínuo e com células imobilizadas. Verificaram após 16 meses de operação que houve remoção de nitrogênio da ordem de $500 \text{ g de N.m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$ de resíduo (de suinocultura). O processo ANAMMOX e o sistema de fluxo contínuo com células imobilizadas mostraram-se tão eficiente quanto o sistema convencional de remoção biológica de nitrogênio, com a vantagem de poder reduzir os custos de tratamento de resíduos de suíno em até quatro vezes. Isso porque o processo ANAMMOX gasta menos energia comparado ao sistema tradicional, já que somente parte do amônio precisa estar sob a forma de nitrito e a remoção de amônio ocorre sem a necessidade de aeração.

Em outro trabalho, Vanotti *et al.* (2005b) utilizaram um sistema de tratamento em escala completa, constituído de um módulo contendo as ANAMMOX (para remoção do N) e outro módulo subsequente de tratamento alcalino (para promover a remoção de fósforo e de patógenos). O sistema foi testado por um ano com a proposta de substituir as lagoas anaeróbias para o tratamento de resíduos de suinocultura. O sistema removeu 97,6% de sólidos suspensos, 99,7% de DBO, 98,5% de NTK, 98,7% de amônia, 95% de fósforo total, 98,7% de cobre e 99,0% de zinco. Também removeu 97,9% dos compostos que apresentavam odor no meio líquido e reduziu os patógenos indicadores em níveis não detectáveis.

3.7A Aplicação da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) para verificar a ocorrência do processo ANAMMOX

A hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) é um método direto que permite identificar células individuais presentes em ecossistemas complexos e que para isso utiliza sondas de oligonucleotídeos, que são sequências curtas de DNA contendo de 17 a 34 nucleotídeos (AMANN *et al.*, 1995). Cada célula “ativa” contém entre 10^3 e 10^5 ribossomos e parte desses são os RNAs ribossomais (RNAr 5S, RNAr 16S e RNAr 23S) (VAN DER MEER *et al.*, 1998). Algumas regiões dos RNAs ribossomais estão acessíveis para a hibridação, que significa que é possível ligar a sonda de oligonucleotídeo, complementar à uma certa região do RNAr 16S, nessa porção do RNAr. Primeiro as células são fixadas (com paraformaldeído-PFA 4%), de modo a manter a integridade da mesma (especialmente a

quantidade de ribossomos) e posteriormente são hibridadas com as sondas. Os RNAs ribossomais alvos fluorescentemente marcados com as sondas permitem identificar as células individualmente através da microscopia de fluorescência (Figura 3.8). Dependendo das sondas utilizadas, o FISH pode ser usado para detectar e quantificar microrganismos de diferentes níveis filogenéticos.

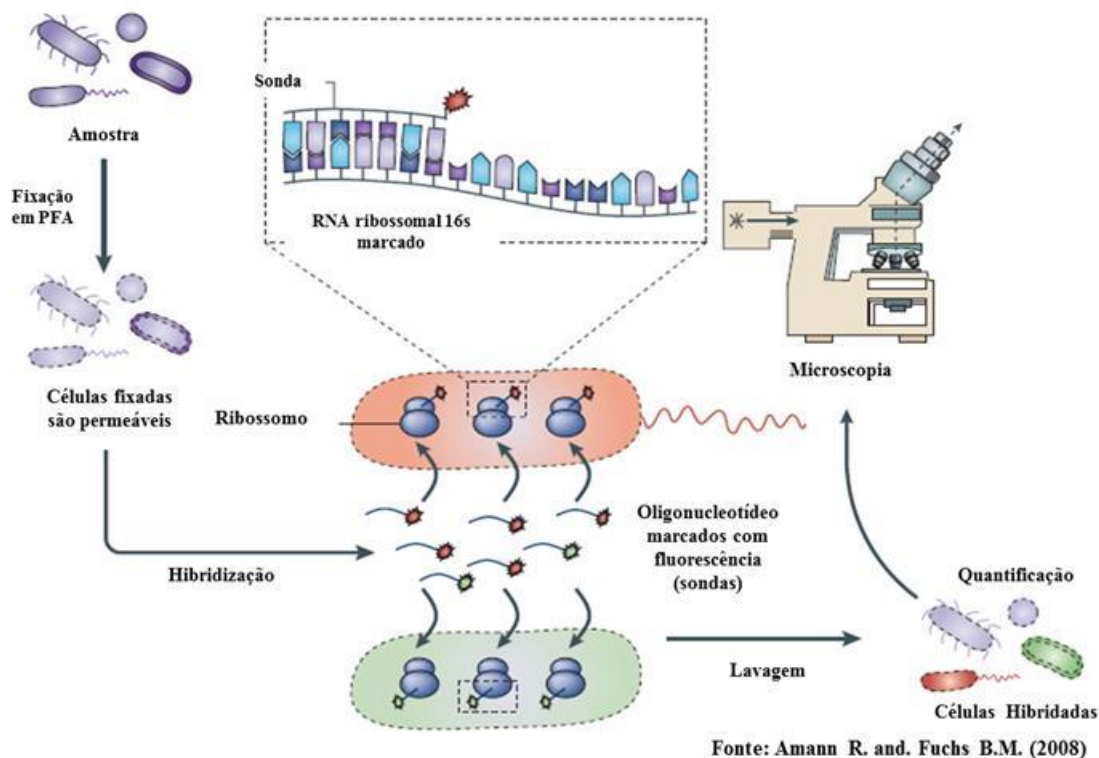


Figura 3.8 - Representação esquemática da técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH).

As sondas vêm sendo desenvolvidas para os níveis taxonômicos mais altos, os Domínios *Archaea*, *Bacteria*, e *Eucarya*; para os níveis intermediários, por exemplo, para as bactérias gram negativas redutoras de sulfato; para as subclasses *Alfa-Proteobacteria*, *Beta-Proteobacteria* (grupo abundante de organismos em ecossistemas de água doce e em sistemas de tratamento de efluentes, como as oxidadoras de amônia) e *Gama-Proteobacteria* (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pertencem à este grupo); para os aglomerados bacterianos do filo CFB (citofago-flavobacterium), para os dois reinos do Domínio *Archaea*: *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*; para as ordens *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* e *Methanococcales* das metanogênicas; e para os taxa menores, gêneros, espécies, e sondas específicas para subespécies (AMANN *et al.*, 1995).

No caso das bactérias ANAMMOX, desde a confirmação da existência do processo (MULDER *et al.*, 1995), até hoje ainda não foi possível fazer o isolamento destas bactérias. Não obstante, Strous *et al.*, (1999) conseguiram purificar (fisicamente por centrifugação em gradiente com percoll) esta bactéria a partir de biomassa enriquecida de um sistema em batelada sequencial que estava removendo nitrogênio pelo processo ANAMMOX. Posteriormente, a partir da amplificação e sequenciamento do DNAr 16S desta bactéria, a mesma foi identificada filogeneticamente como sendo membro da ordem *Planctomycetales*, denominada de *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Até o momento, não pode ser cultivada utilizando as técnicas tradicionais de cultivo. Mas pode ser localizada através da técnica de FISH usando a sonda desenvolvida pelos autores: S-G-Amx-1015-a-A-18 (5'GAT ACC GTT CGT CGC CCT-3'). Desde então outras sondas (descritas na Tabela 3.6) foram desenvolvidas e vêm sendo usadas para investigar a presença de bactérias ANAMMOX em sistemas de tratamento de águas residuárias contendo suprimento de oxigênio limitado e com alta carga de nitrogênio conforme descrito na Tabela 3.7.

Tabela 3.6 - Sondas de oligonucleotídeos usadas no FISH para detectar *Planctomicetos* e bactérias ANAMMOX

Sonda	Grupo Alvo	Seqüência (5' para 3')	Referência
PLA46	Ordem <i>Planctomicetales</i> RNAr 16S, posição 45-62	GACTTGCATGCCTAATCC	Neef <i>et al.</i> (1998)
S*-Amx 0368a-A-18	Todos os gêneros de ANAMMOX já descritos (<i>Brocadia</i> , <i>Kuenenia</i> , <i>Scalindua</i>)	CCTTTCGGGCATTGCGAA	Schmid <i>et al.</i> (2003)
S*-Amx-0820- a-A-22	Gêneros <i>Ca. Brocadia</i> <i>anammoxidans</i> e <i>ca. Kuenenia</i> <i>stuttgartiensis</i>	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	Schmid <i>et al.</i> (2000)
Amx1240	<i>Brocadia anammoxidans</i>	TTTAGCATCCCTTTGTACCAACC	Strous (2000)
Kst1273	<i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	TCGGCTTTATAGGTTTCGCA	Schmid <i>et al.</i> (2000)
S-G-Sca- 1309-a-A-21	Gênero <i>ca. Scalindua</i>	TGGAGGCGAATTTTCAGCCTCC	Schmid <i>et al.</i> (2003)
S*-Scabr- 1114-a-A-22	<i>Ca. Scalindua brodae</i> , <i>Ca. Scalindua wagneri</i>	CCCGCTGGTAACTAAAAACAAG	Schmid <i>et al.</i> (2003)
S*-BS-820-A- a-22	<i>Ca. Scalindua sorokinii</i>	TAATTCCTCTACTTAGTGCCC	Kuypers <i>et al.</i> , 2003

Tabela 3.7- Investigação da presença de organismos ANAMMOX em diferentes sistemas de remoção de nitrogênio (de acordo com Jetten *et al.*, 2002)

Sistema	Fonte de amônia	Forma de detecção	Referência
Biodiscos (Kollikon, Suíça)	Lixiviado	Atividade ANAMMOX e FISH	Egli <i>et al.</i> 2001
Biodiscos (Mechernich, Alemanha)	Lixiviado	Atividade ANAMMOX e FISH	Helmer <i>et al.</i> 2001 e Schmid <i>et al.</i> 2005
Filtro biológico (Stuttgart, Alemanha)	Água residuária	Perda de N, Atividade Anammox e FISH	Schmid <i>et al.</i> 2000
Reator com biofilme (Sidney, Austrália)	Água de Coqueria	Atividade ANAMMOX e FISH	Jetten 2001
<i>Wetland</i> de água doce (Uganda)	Água	Perda de N e FISH	Strous & van Kuijck
Reator de Leito Fluidizado (Holanda)	Meio mineral	Atividade ANAMMOX e FISH	Van de Graaf <i>et al.</i> 1997
Reator em batelada sequencial (Holanda)	Meio mineral	Atividade ANAMMOX e FISH	Strous <i>et al.</i> , 1998
Reator em batelada sequencial	Água residuária	Atividade ANAMMOX e FISH	Van Dongen <i>et al.</i> , 2001

Vários trabalhos têm utilizado técnicas de biologia molecular, dentre elas o FISH, para acompanhar o desenvolvimento de populações microbianas nos bioreatores estudados (ARAUJO *et al.*, 2000, 2004; EGLI *et al.*, 2001; JETTEN *et al.*, 2001; MONTENEGRO *et al.*, 2003; DAPENA-MORA *et al.*, 2004; GÜVEN *et al.*, 2005; THIRD *et al.* 2005; ISAKA *et al.*, 2006).

Com a técnica de FISH, pode-se não somente determinar a morfologia da célula de um organismo não cultivado (como é o caso das bactérias ANAMMOX) e a sua abundância, como também analisar a sua distribuição espacial *in situ*. Portanto, no caso de biofilmes essa técnica é muito valiosa, pois pode-se identificar, com os biofilmes fixados no suporte, as células microbianas presentes em cada camada do mesmo com auxílio da microscopia com focal de varredura a laser. Além disso, pode-se com os biofilmes em suspensão, nos quais as

células foram removidas do suporte, concentradas e suspensas em meio líquido, quantificar os principais grupos microbianos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégias utilizadas para o enriquecimento da ANAMMOX

Para o enriquecimento das bactérias ANAMMOX, foram utilizadas três estratégias diferentes: (i) enriquecimento em reator batelada com e (ii) sem adição de cloranfenicol, e (iii) em reator sequencial em batelada. O cloranfenicol foi testado e usado por ser um antibiótico capaz de inibir as bactérias desnitrificantes mesofílicas, que podem competir pelo consumo de nitrito com as bactérias ANAMMOX; como as primeiras apresentam velocidade de crescimento muito maior em relação à segunda população, são melhores competidoras e impedem o enriquecimento das ANAMMOX (TOH *et al.*, 2002).

4.2 Lodo de inóculo para os reatores

Como inóculo para os reatores usados no enriquecimento das ANAMMOX, foram utilizadas amostras de lodo provenientes do CePTS (Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento da UFMG/COPASA) e do sistema de lodos ativados da ETE Arrudas COPASA. A amostra de lodo aeróbio (1 litro) foi coletada da etapa de recirculação do decantador secundário da ETE Arrudas (Figura 4.1A), enquanto a amostra de lodo anaeróbio (1 litro) foi proveniente de um reator UASB (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo) instalado na planta experimental do CePTS, coletado a uma altura de 0,70 m do fundo do reator (Figura 4.1B).

A escolha destas amostras foi motivada pela pesquisa realizada por Araújo & Chernicharo (2007). Naquele trabalho, foi detectada a presença de bactérias ANAMMOX (através da técnica de biologia molecular da PCR- reação em cadeia da DNA polimerase) nos referidos lodos, bem como em amostra de lixiviado de aterro sanitário da cidade de Belo Horizonte.

Assim que as amostras chegaram ao laboratório, foram realizadas as análises de sólidos totais voláteis (STV), segundo procedimentos do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2005, para determinar a concentração de biomassa celular do lodo em g STV.L⁻¹.



Figura 4.1 - (A) Foto da etapa de recirculação do decantador secundário do sistema de lodos ativados da ETE Arrudas COPASA (vazão média de $1,86\text{m}^3/\text{s}$) e **(B)** Foto do reator UASB do CePTS, com volume de 22 m^3 e vazão média afluyente de $2,88\text{ m}^3/\text{h}$.

4.3 Preparo dos reatores e do meio de cultura

Os reatores foram constituídos de frascos tipo Schott de 1.250 mL, fechados com rolha de butila e tampa de rosca, contendo aproximadamente 1.000 mL de meio de cultura autotrófico específico para o enriquecimento das bactérias ANAMMOX, conforme descrito em Dapena-Mora *et al.* (2004) e van de Graaf *et al.* (1996). A composição do meio autotrófico está descrita na Tabela 4.1.

O meio de cultura foi preparado em béquer de vidro de 1000 mL, dissolvendo-se os quatro primeiros componentes do meio, de acordo com a ordem apresentada na Tabela 4.1. O pH foi reduzido para 5,8 e após o ajuste do volume final da solução para 1000 mL em balão volumétrico, retirou-se 7,05 mL desta solução. Utilizou-se um medidor de pH de bancada, calibrado com soluções tampão 4,01 e 7,00 (marca Merck). Para o ajuste do pH da solução, foi utilizada solução H_2SO_4 1,0N. Este meio foi então transferido para o frasco tipo *Schott*, vedado com tampa rosqueável, e posteriormente autoclavado em vapor úmido por 30 minutos a $120\text{ }^\circ\text{C}$. Após o resfriamento deste meio e sob condições de assepsia, em capela de fluxo laminar e bico de Bunsen, adicionaram-se os componentes seguintes para obtenção das respectivas concentrações finais, conforme demonstrado na Tabela 4.1:

- 2,4 mL da solução 0,5M de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (concentração final $0,18 \text{ g.L}^{-1}$),
- 2,4 mL da solução 0,5M de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (concentração final $0,3 \text{ g.L}^{-1}$),
- 1,0 mL da solução de micronutrientes I (composição descrita na tabela 4.2)
- 1,25 mL da solução de micronutrientes II (composição descrita na tabela 4.2)

Tabela 4.1 - Composição do meio mineral autotrófico

Componentes	Concentração (g.L^{-1})
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,132 - 0,396 (concentrações variaram de 1mM até 3mM)
NaNO_2	0,068 - 0,204 (concentrações variaram de 1mM até 3 mM)
KHCO_3	1,25
KH_2PO_4	0,027
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,18
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3
Solução de micronutrientes I	1,0 mL
Solução de micronutrientes II	1,25 mL

Fonte: Dapena-Mora *et al.*, (2004) e Van de Graaf *et al.*, (1996)

As soluções de micronutrientes I e II foram preparadas de acordo com Dapena-Mora, *et al.*, (2004), e estão descritas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Composição das soluções de micronutrientes

Componentes	Concentração (g.L^{-1}) para a solução I	Concentração (g.L^{-1}) para a solução II
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,25	15,0
FeSO_4	6,25	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	0,43
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	0,24
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	0,99
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-	0,25
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	0,22
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	0,19
Na_2SeO_3	-	0,08
H_3BO_4	-	0,014

Fonte: Dapena-Mora *et al.*, (2004)

O procedimento teve auxílio de micropipetas calibradas de 100 a 1000 μL , marca Eppendorf. Todo o procedimento das práticas de preparo das soluções seguiu o APHA (2005).

Após a adição destas soluções, fluxionou-se gás argônio 100%, sob condições de assepsia, por 45 minutos no meio de cultura para torná-lo anaeróbico, sendo 5 minutos na atmosfera do frasco. Tampado o frasco, adicionava-se 1,0 mL de solução de sulfito de sódio 10 mM

(Na_2SO_3) para remover quantidades traço de oxigênio dissolvido no meio líquido, conforme citado por Tsushima *et al.* (2007). O pH final do meio de cultura foi então ajustado para 7,0-7,5, com solução de H_2SO_4 1,0 N. A concentração inicial de nitrito (usado comoceptor final de elétrons), fornecido na forma de NaNO_2 , e amônio (usado como doador de elétrons), fornecido na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, variou de acordo com cada reator, como pode ser verificado na tabela 4.3 (item 4.4 - Montagem e características dos reatores).

As soluções de micronutrientes I e II, bem como as soluções estoque de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,5M) e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5M) e os utensílios utilizados, também foram devidamente esterilizados a 120 °C em vapor úmido por 30 minutos. Nestas soluções, previamente à esterilização, fluxionava-se o gás argônio (100%) por 20 minutos, garantindo a anaerobiose nas mesmas. Estas soluções foram estocadas em frascos âmbar, a 4°C por 2 a 3 meses. Foi utilizada água Milli-Q ultrapura (do ultrapurificador da Millipore) para diluição e preparo das soluções, com características de condutividade menor ou igual a 18,2 mΩ.cm a 25°C e carga bacteriana menor que 1 unidade formadora de colônia por mL.

4.4 Montagem e características dos reatores

Para o enriquecimento das ANAMMOX, foram utilizados sete reatores (sendo um de controle), alguns com condições e inóculos diferentes. As características de cada um deles, bem como o tempo de operação, encontram-se descritas na Tabela 4.1. O frasco controle, contendo somente meio de cultura, sem biomassa, foi montado para verificar se haveria degradação da amônia e do nitrito por fatores abióticos.

O volume de inóculo utilizado em cada reator variou de 50 a 200 mL, conforme também apresentado na Tabela 4.3. Os lodos foram previamente centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos, antes de serem adicionados aos reatores contendo meio de cultura autotrófico e anaeróbico, com o objetivo de eliminar a matéria orgânica (DQO) e os compostos nitrogenados presentes no meio líquido (provenientes do esgoto doméstico).

A adição do inóculo aconteceu sob condições assépticas e anaeróbicas, pois o gás argônio (100%) foi fluxionado no meio líquido do reator, no momento da adição do inóculo e por mais dez minutos. Em seguida, o frasco foi fechado com rolha de butila esterilizada e tampa de rosca. A atmosfera do frasco foi trocada através de fluxo de gás (argônio 95% e dióxido de carbono 5%), por meio de agulhas hipodérmicas por dez minutos. Desse modo, fornecia-se dióxido de carbono (CO_2) dissolvido no meio, para permitir o crescimento das ANAMMOX,

que são autotróficas. Todos os reatores foram incubados sob agitação (190 - 200 rpm) em estufa *shaker* (marca Marconi MA-420), a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, na ausência de luz para não haver crescimento de algas.

Tabela 4.3 - Características dos reatores e tempo de operação

Reator	Tipo de inóculo	Volume do inóculo	Adição de cloranfenicol	Concentração inicial de nitrito e amônia	Concentração de STV no reator (g.L ⁻¹)	Modo de operação	Tempo de operação (dias)	Período de operação
F1	lodo UASB	100 mL	Sem	14 e 28 mg/L	3,5	34 dias: batelada; após sequencial em batelada; Dia 286: com meio suporte	357	Março/07 a Março 08
F2	lodo UASB	150 mL	Sem	14 e 28 mg/L	1,11	sequencial em batelada	243	Abril/07 a Dezembro/07
F3	lodo ativado	200 mL	Com	21 e 28 mg/L	1,0	batelada	430	Maio/07 a Agosto/08
F4	lodo ativado	50 mL	Sem	28 e 28 mg/L	0,15	batelada	257	Setembro/07 a Fevereiro/08
F5	lodo UASB	50 mL	Sem	28 e 28 mg/L	0,5	batelada	231	Julho/07 a Junho/08
F6	lodo UASB	50 mL	Com	28 e 28 mg/L	1,3	batelada	358	Agosto/07 a Agosto/08
F _c (Controle)	Sem lodo	-	Sem	42 e 42 mg/L	-	batelada	162	Fevereiro/08 a Agosto/08

4.5 Operação e monitoramento dos reatores

4.5.1 Operação dos reatores

Nos reatores F3, F4, F5 e F6, operados sob a forma de batelada, quando a concentração de nitrito e/ou de amônia caía para 2,0 a 4,0 mg.L⁻¹ (indicando consumo), era feita a adição de soluções estoque de nitrito de sódio 600mM e/ou de sulfato de amônio 600mM, a fim de manter estes compostos (nitrito e amônia) nas concentrações dos respectivos sistemas. Calculava-se o volume de solução a ser adicionada, de modo a atingir a concentração final no reator de 21 a 28 mg de N-NO₂⁻.L⁻¹ (dependendo do reator) e 28 mg de N-NH₄⁺.L⁻¹.

A partir da primeira adição, estes reatores então passaram a ser operados sob a forma de batelada alimentada. Eventualmente, nestes reatores, foram realizadas algumas trocas de meio de cultura velho, por meio de cultura fresco. Utilizava-se tal procedimento quando se detectava aumento na concentração de amônia nos reatores (provavelmente devido à morte e lise celular), objetivando a relação de N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻ em torno de 1:1 e/ou 1:1,2.

Nos reatores F1 e F2, operados sob a forma de batelada sequencial, foi realizada a troca do meio de cultura autotrófico pelo menos três vezes por semana. O procedimento de troca do meio de cultura consistia em retirar cerca de 200 a 300 mL de meio velho de dentro do reator (por meio de seringas estéreis de 20 mL) e, posteriormente, repor esse volume através da adição de meio de cultura fresco (previamente autoclavado e anaeróbico), contendo 1,5 mM de nitrogênio amoniacal (NH₄⁺) e 3 mM de nitrogênio nitroso (NO₂⁻). Portanto, em cada troca se adicionava, aproximadamente, 8 mg.L⁻¹ de nitrito e de amônia. Fazia-se este procedimento após decantação total da biomassa do reator (o frasco era deixado em repouso por 30 minutos), de modo que somente o meio de cultura era retirado e não o lodo. Após cada troca era feita adição de gás (mistura de argônio (95%) e CO₂ (5%)), por aproximadamente 7 minutos, na atmosfera do reator. Utilizava-se agulhas hipodérmicas estéreis conectadas ao tubo de gás neste procedimento. Nos 60 dias iniciais de incubação, as trocas de meio nesses reatores ocorreram diariamente, portanto, no prazo de 5 dias, todo o líquido do reator havia sido substituído (representando um tempo de detenção hidráulica - TDH de 5 dias). Posteriormente, as trocas passaram a ser realizadas três vezes por semana, de maneira que, no prazo de uma semana, todo o líquido do reator foi totalmente substituído (TDH de 7 dias). Após aproximadamente 9 meses de operação nesta condição, as trocas passaram a ocorrer duas vezes por semana, representando, portanto, um TDH de 14 dias. Sempre após a troca do

meio, fluxionava-se o gás (mistura de Argônio (95%) e CO₂ (5%)) na atmosfera dos frascos, de modo a garantir a anaerobiose na mesma.

Nos reatores F3 e F6, houve periodicamente adição de solução de cloranfenicol 5,0% ou 10% na concentração final máxima de 100 mg.L⁻¹. O cloranfenicol (marca Sigma) foi testado e usado por ser um antibiótico capaz de inibir as bactérias desnitrificantes mesofílicas, que podem competir pelo consumo de nitrito com as bactérias ANAMMOX; como as primeiras apresentam velocidade de crescimento muito maior em relação à segunda população, são melhores competidoras e impedem o enriquecimento das ANAMMOX (TOH *et al.*, 2002). Sempre que o consumo de nitrito era intenso e a amônia não era consumida (indicando atividade desnitrificante), eram adicionados de 0,1 a 0,3 ml de cloranfenicol (5,0%), resultando em concentração final de 5 a 15 mg.L⁻¹. Durante o experimento, houve variação no uso da solução de cloranfenicol, sendo utilizada solução aquosa ou alcoólica. A variação foi justificada pelo alto custo do cloranfenicol solúvel em água, quando comparado com o cloranfenicol solúvel em álcool.

Periodicamente, foram adicionados 1,0 mL da solução de hidrazina (100 mM) e 1,0 mL da solução de hidroxilamina (100 mM) nos reatores F5, F6 e F9, de modo que a concentração final em cada reator fosse de 0,1mM, na tentativa de estimular a atividade ANAMMOX. De acordo com Third *et al.* (2005), como estes compostos são intermediários da reação ANAMMOX, a presença deles no início da incubação pode ajudar a acelerar a reação e diminuir o tempo para enriquecer as ANAMMOX.

A adição de qualquer solução (de amônia, nitrito, cloranfenicol, hidrazina, ou hidroxilamina), de meio de cultura ou retirada de meio líquido dos reatores, foi feita por meio de seringas com agulhas hipodérmicas (estéreis) e sob condições assépticas (conforme ilustrado na Figura 4.2).

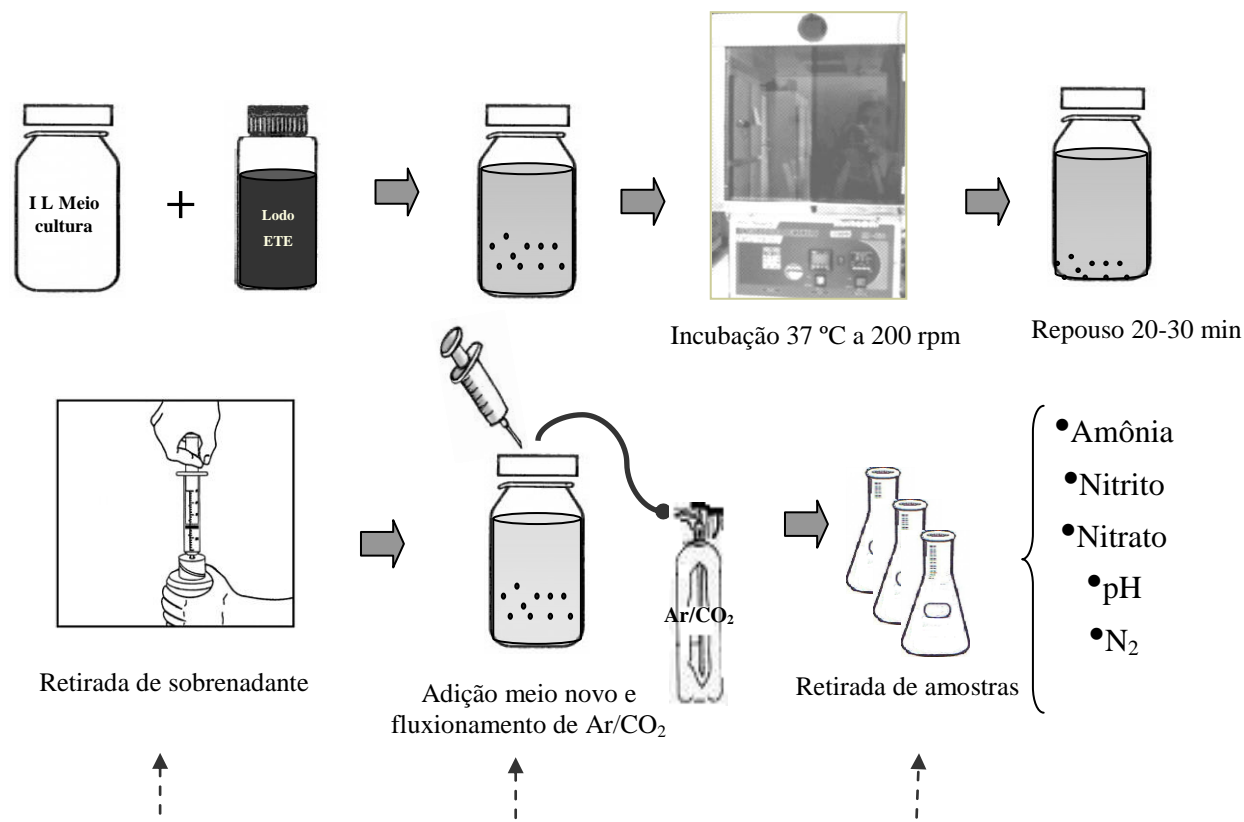


Figura 4.2 - Desenho esquemático do procedimento de manipulação dos reatores, com relação à retirada de meio líquido para posteriores análises físico-químicas e/ou adição de soluções ao reator.

4.5.2 Monitoramento analítico dos reatores

A retirada de amostra do meio líquido dos reatores, para caracterização físico-química, foi realizada de uma a três vezes por semana, e sempre antes ou após a adição de qualquer solução em cada reator. Para isso, foram retirados cerca de 10 mL do meio líquido, após decantação total do lodo, garantindo a retirada somente do sobrenadante.

O monitoramento analítico foi feito para determinação do pH, da concentração de amônia, nitrito e nitrato, de modo a verificar se a amônia e o nitrito estavam sendo consumidos e se nitrato estava sendo formado. As análises de determinação da concentração de nitrato e da proporção de nitrogênio gasoso (presente no biogás formado na atmosfera dos reatores) foram realizadas esporadicamente. A frequência e os parâmetros analisados para cada reator estão descritos na tabela 4.4.

O meio de cultura autotrófico, após preparação, também era monitorado de modo a confirmar as concentrações de amônia e nitrito e determinação do pH.

Tabela 4.5 - Métodos analíticos utilizados

Análise	Método e Referência	Equipamento
Nitrito	Método colorimétrico do ácido sulfanílico 4500-B (APHA,2005)	Espectofotômetro DR2800 Hach
Amônia	Método do Fenato 4500 NH ₃ -F (APHA,2005)	Espectofotômetro DR2800 Hach
Nitrato	Método do salicitado segundo Rodier (1981)	Espectofotômetro DR2800 Hach
pH	Método 4500-H ⁺ -B (APHA,2005)	Medidor de pH HANNA
Porcentagem de Nitrogênio gasoso no biogás	Análise por cromatografia gasosa	Cromatógrafo Perkin Elmer Auto System XL e coluna da Supelco, 60/80 Carboxen-1000, 15'X 1/8" SS (2.1 mmID))

4.6 Procedimentos das análises físico-químicas

4.6.1 Determinação de amônia

A análise de amônia foi conduzida segundo o Método colorimétrico 4500 NH₃ F - Método do Fenato segundo o APHA (2005), modificado segundo Carmouse (1994). O princípio do método se baseia na formação de um composto de cor azul intensa, o indofenol, proveniente da reação da amônia, hipoclorito e fenol catalizado por nitroprussiato de sódio, segundo a reação química apresentada na Figura 4.4:

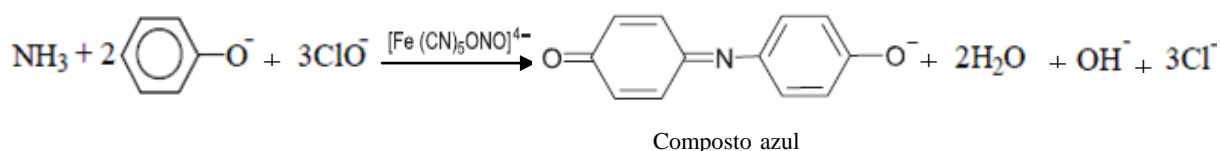


Figura 4.4 - Reação química da amônia com fenol para formar o indofenol na análise de amônia.

Inicialmente, foram preparadas as soluções de fenol 1%, solução de nitroprussiato de sódio 0,5% e solução alcalina. A solução antioxidante foi preparada imediatamente antes do desenvolvimento da análise (uma vez que se mantém estável por no máximo 4 horas, tampada) misturando-se quatro partes de solução alcalina com uma parte de reagente hipoclorito de sódio 5%. Esta solução foi preparada apenas em volume necessário para o número de ensaios realizados no dia de uso, incluindo o branco.

Procedeu-se com amostra em triplicata em tubos tipo Falcon com tampa rosqueável, além do branco (feito em duplicata). As amostras eram diluídas quando o teor de nitrogênio amoniacal excedia a faixa de leitura da curva padrão.

Assim, pipetou-se 5,0 mL de amostra (água ultrapura no caso do branco) e adicionou-se 200µL de solução de fenol 1% com auxílio de micropipeta, agitando bem para garantir a mistura. Na seqüência, foram adicionados mais 200 µL da solução de nitroprussiato de sódio 0,5%, cuidando para agitar bem. Finalmente, foram adicionados 500 µL da solução oxidante recém preparada, homogeneizando bem a mistura no frasco. Os frascos foram tampados e mantidos ao abrigo de luz e em temperatura ambiente, num intervalo de quatro a vinte e quatro horas para a leitura. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (HACH DR, 2800) a 630 nm, usando cubeta de vidro redonda. Com a leitura da absorbância, foi obtido o valor da concentração de amônia a partir da equação da reta gerada da curva padrão, visto na equação 4.1 (válida para $r^2 > 0,99$). O valor final da concentração de amônia na amostra (e no branco) era obtido substituindo o valor de “Y” pela leitura de absorbância feita no aparelho, cuidando para subtrair o valor do branco lido no espectrofotômetro. O resultado final consistia da concentração de amônia em mg.L^{-1} multiplicado pelo fator de diluição da amostra (quando for o caso).

A curva de calibração era preparada mensalmente e/ou sempre que uma das soluções terminasse. Tal curva padrão foi realizada plotando-se no espectrofotômetro leituras de absorbância de soluções estoque de amônia 100µM (preparada a partir de solução padrão de amônia) em diferentes concentrações (70, 140, 280, 420, 560, 840, 1120 e 1400 µL). O preparo das soluções padrão e estoque de amônia estão descritos nos itens 4.6.16 e 4.6.17, respectivamente.

$$Y = a.X + b$$

Eq. 4.1

Na equação 4.1: Y= absorbância e X= concentração de amônia (mg.L^{-1}).

4.6.2 Determinação de nitrito

A análise de nitrito foi realizada segundo o Método Colorimétrico 4500 NO_2 - B do APHA (2005), onde o nitrito reage com o ácido sulfanílico, sob condições ácidas, para formar um íon diazônio. Este íon acopla com um composto α naftil para formar um corante azo vermelho violeta, conforme reação da figura 4.5. A leitura foi feita colorimetricamente em espectrofotômetro (HACH DR 2800) a 543 nm, utilizando cubeta quadrada de 1 cm de comprimento ótico. Obteve-se a concentração de nitrito em mg.L^{-1} por leitura direta no equipamento, através da curva de calibração inserida no espectrofotômetro. O resultado final

do teor de nitrito na amostra foi obtido multiplicando-se o valor lido em mg.L^{-1} pela diluição da amostra (quando for o caso).

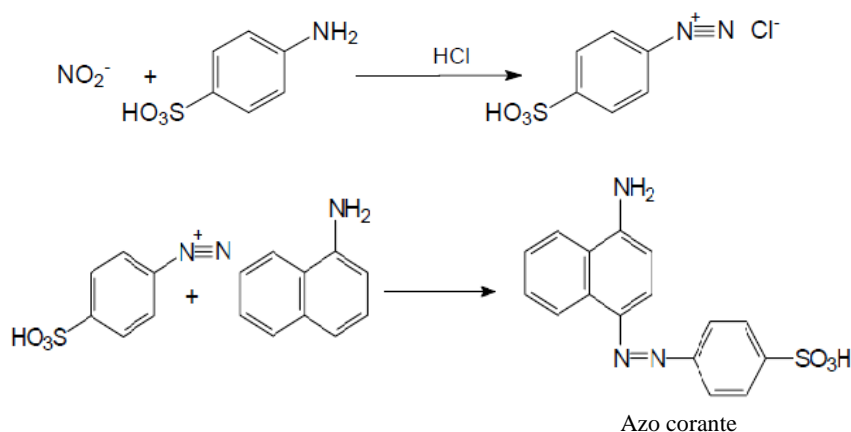


Figura 4.5 - Reação química do nitrito com ácido sulfanílico e acoplamento do N-naftil para formar o azo corante na análise de nitrito.

Inicialmente, foi preparado o reagente de cor para a execução da análise. Pipetou-se 5,0 mL de amostra (ou porção diluída da amostra) em tubos tipo falcon de tampa rosqueável e adicionou-se 200 μL de reagente de cor, agitando bem. Após repouso por 20 minutos para promover a reação, a amostra foi lida no espectrofotômetro para quantificação do teor de nitrogênio nitroso presente na amostra. Realizou-se o branco com uso de água ultrapura.

A curva padrão era preparada mensalmente e foi inserida no equipamento através de leitura da concentração de nitrito em soluções padrão de diferentes concentrações, na faixa de leitura de 1,0 a 500,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de N-NO_2^- (válida para $r^2 > 0,999$). Na execução da curva de calibração foram realizadas soluções estoque, solução intermediária e solução padrão de nitrito.

4.6.3 Determinação de nitrato

A análise de nitrato na amostra foi realizada pelo método do salicilato sódico descrito por Rodier (1981). Em presença de salicilato sódico, os nitratos formam o composto paranitrosalicilato sódico de cor amarelada, susceptível à determinação colorimétrica em espectrofotômetro a 415 nm. Utilizou-se cubeta quadrada com 2,5 cm de caminho ótico na leitura, obtendo a concentração de nitrato em mg.L^{-1} por leitura direta no equipamento, através da curva de calibração inserida no espectrofotômetro (HACH DR2800). O resultado final de nitrogênio nítrico na amostra foi obtido multiplicando-se o valor lido (em mg.L^{-1}) pela diluição da amostra (quando for o caso).

Inicialmente, foram preparadas as soluções de salicilato sódico 5% e solução de tartarato de sódio e potássio. A solução de salicilato de sódio 5% era preparada no dia de uso, pois tem validade de 24 horas.

Introduziu-se 10,0 mL de amostra (ou porção diluída da amostra) em um béquer de 200 mL e ajustou o pH até 8,5 com uso de solução de hidróxido de sódio. Amostras que apresentaram turbidez foram adicionadas de 0,5g de carvão ativado. Neste caso, o branco da análise seguiu o mesmo procedimento. Após cinco minutos de reação, a solução foi filtrada em papel de filtro para filtração rápida de 15 cm de diâmetro (marca S&S). Pipetou-se 10,0 mL de amostra do filtrado (quando era o caso) em béquer de 50 mL e adicionou-se 1,0 mL de solução de salicilato de sódio 5%. Em amostras onde a concentração de nitrito era maior que 2,0 mg.L⁻¹ foi adicionado 0,05 g de sulfamato de amônio p.a (marca Fluka) para evitar a interferência do nitrito na leitura de nitrato da amostra. Os béqueres com a amostra e o branco foram colocados em banho maria a 75-80°C deixando secar totalmente. Após etapa de secagem da amostra foram adicionados 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, permitindo sua impregnação no resíduo durante um repouso de dez minutos. Terminada esta etapa, foi feita adição de 15,0 mL de água ultrapura e 15,0 mL de solução de tartarato de sódio e potássio, homogeneizando bem a cada adição. Assim que a amostra esfriou, foi feita a leitura no espectrofotômetro em no máximo duas horas.

A curva de calibração foi obtida introduzindo-se no espectrofotômetro leituras de absorbância de soluções padrão de amônia (preparada a partir de solução estoque de nitrato) nas concentrações 0,5, 0,75, 1,0, 3,0 e 5,0 mg.L⁻¹ (válida para $r^2 > 0,99$).

4.6.4 Determinação dos sólidos totais e voláteis

Sólido total é o resíduo sólido na cápsula de porcelana após secagem em forno à temperatura definida, segundo o APHA (2005). No caso da técnica para análise de sólidos provenientes de resíduos de tratamento de águas residuárias (lodo), a temperatura de secagem aplicada é de 103-105°C.

A determinação de sólidos voláteis é feita submetendo a amostra à temperatura mais alta (550°C no caso), o que permite a volatilização e decomposição de matéria orgânica.

A técnica realizada nas amostras de lodo seguiu o método 2540-G do APHA (2005). Adicionou-se 50,0 mL de amostra de lodo em uma cápsula de porcelana tarada e pesada. Esta

cápsula foi colocada em banho maria a 90°C por uma hora e depois em estufa aquecida a 105°C por mais uma hora para etapa final de secagem.

Para análise dos sólidos voláteis, a mesma cápsula foi submetida à temperatura de 550°C em mufla para queima por mais uma hora. O cálculo dos sólidos totais voláteis da amostra foi feito segundo a equação 4.2:

$$\% \text{ sólidos totais voláteis (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{(A - D) \times 100}{V}$$

Eq. 4.2

Sendo: A = peso da cápsula com resíduo seco em estufa;
D = peso da cápsula com resíduo após queima em mufla;
V = volume da amostra (L)

O valor final da concentração dos sólidos totais e voláteis (em mg.L⁻¹) na amostra foi então calculado matematicamente por regra de três, uma vez que utilizou-se apenas 50,0 mL da amostra.

4.6.5 Medição de pH

O princípio da medição eletrométrica de pH, segundo o método 4500-H+ B do *APHA* (2005), é a determinação da atividade dos íons hidrogênio pela medição potenciométrica, usando um eletrodo padrão de hidrogênio e um eletrodo de referência. Uma força eletromotiva produzida no sistema do eletrodo de vidro varia linearmente com o pH, sendo seu valor extrapolado e definido como uma escala potenciométrica. O aparelho de medição é calibrado potenciometricamente nos eletrodos de vidro e de referência com uso de soluções tampão de concentração conhecida. É exibida uma escala de 0 a 14, sendo a resolução da leitura variável com o aparelho usado.

No experimento foi utilizado um equipamento de medição de pH de bancada (marca Hanna) e eletrodo de vidro com resolução de 0,01 pH acoplado ao medidor de temperatura, com faixa de leitura de 0,0 a 14,0. A calibração era feita diariamente com uso de soluções tampão 4,01 e 7,00 (marca MercK).

O eletrodo era inserido na amostra e o valor era obtido pela leitura direta na tela do equipamento.

4.7 Preparo das soluções de uso no meio de cultura e na operação dos reatores

Todas as soluções na operação dos reatores foram preparadas e utilizadas no laboratório de análises físico-química do Departamento de Engenharia Sanitária da UFMG.

A técnica de preparo de cada solução está descrita no Anexo I.

4.8 Análise por FISH

Foram realizadas algumas análises microbiológicas, utilizando a técnica de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) nos lodos utilizados como inóculo, bem como da biomassa desenvolvida nos reatores. Os procedimentos seguiram os protocolos descritos por Amann (1995) e Egli *et al.* (2001). As análises foram realizadas no laboratório de microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária da UFMG (DESA) pelas técnicas capacitadas para tal análise.

Cerca de 1,0 a 2,0 ml de lodo proveniente do reator UASB e do sistema de lodos ativados, e de 5,0 a 15,0 ml de amostra (meio líquido mais biomassa) dos reatores (coletadas em diferentes dias de operação), foram centrifugadas a 8.600 rpm por oito minutos. Posteriormente, essas amostras foram lavadas por duas vezes com 500 µL de PBS (tampão fosfato salino - PBS 1X: 130 mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄, pH 7,2). O *pellet* resultante foi ressuscitado em 750 µL de tampão de fixação (contendo paraformaldeído 4% em PBS) e 250 µL de PBS 1X (diluído uma vez) e após homogeneização, a amostra foi incubada a 4°C (geladeira) por doze horas. Após a fixação e lavagem com PBS 1X, esta amostra foi ressuscitada em 500µL de PBS 1X e 500 µL de etanol 100%. A amostra fixada foi estocada em freezer a – 20°C até que o procedimento de hibridação fosse realizado.

Para a hibridação, cerca de 1,0 a 5,0 µL das amostras fixadas foram aplicadas em cada pocinho da lâmina de vidro coberta com teflon. Esperou-se a amostra secar na lâmina (colocando a mesma em estufa a 45 °C por vinte minutos). Após esta etapa foi feita a desidratação da amostra, mergulhando a lâmina em solução de etanol de concentrações progressivas (50%, 80% e 100%), por três minutos em cada concentração.

Após secagem da lâmina, procedeu-se a hibridação propriamente dita, que consistiu da aplicação (sobre cada pocinho) de 9,0 µL do tampão de hibridação (20mM Tris-HCl, pH 7,

5mM EDTA, 0,01%SDS, 900mM NaCl, com 25% de formamida) e 1,0 µL da sonda Amx 820 (STROUS , 2000). Esta sonda (sequência: 5´aaaaccctctacttagtggccc 3´) é específica para a detecção das bactérias ANAMMOX dos gêneros *Brocadia anammoxidans* e *Kuenenia stuttgartiensis*, estava marcada com o corante fluorescente Cy3 e foi adquirida da Promicro (São Paulo). Após hibridação, a lâmina foi incubada em câmara úmida a 46°C por noventa minutos. As condições de hibridação usadas foram as mesmas descritas em EGLI *et al.* (2001). Após a hibridação foi feita a lavagem da lâmina a 48°C por quinze minutos, em tampão de lavagem. A composição deste tampão foi semelhante ao tampão de hibridação, porém não continha formamida e apresentava concentração de NaCl menor (159mM), comparado ao tampão de hibridação. Após a lavagem, a lâmina foi corada com uma solução de DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol, marca SIGMA) 0,001%, por dez minutos, no escuro. Após lavagem com água destilada, e secagem completa da lâmina, cerca de 4,0 µL da solução montante de PBS/glicerol foram aplicadas sobre cada pocinho e, posteriormente, colocou-se a lamínula. As lâminas prontas foram observadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX-50, em aumento de 1.000 vezes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do lodo de inóculo

O volume de inóculo usado nos reatores variou de 5 a 20% (v/v) de lodo em relação ao volume de meio de cultura em cada reator (1 litro). Toh *et al.*, (2002), em experimento de enriquecimento de ANAMMOX em batelada, usaram 5% de lodo (v/v) como inóculo. Já Sanchez-Melsió *et al.*, (2009), usaram 20% de lodo (ou sedimento) (v/v) como inóculo. No reator F3, utilizou-se 200 mL de lodo ativado como inóculo, para garantir que estava sendo adicionada alta concentração de biomassa. Posteriormente, para os reatores F4, F5 e F6, utilizou-se 50 mL de lodo para verificar se um volume menor de lodo favoreceria mais as ANAMMOX, já que um volume maior de lodo poderia conter substâncias tóxicas e inibidoras para esta população (VAN de GRAAF *et al.*, 1996; JETTEN *et al.*, 1999).

Os lodos utilizados como inóculo nos reatores em batelada, coletados do reator UASB e do sistema de recirculação do sistema de tratamento da ETE Arrudas COPASA, foram analisados quanto ao teor de sólidos totais voláteis para determinação da concentração de biomassa inoculada. Esses valores são apresentados na Tabela 5.1. Conforme pode ser verificado, os lodos não apresentaram valor uniforme com relação à concentração de STV, e, portanto, a concentração de biomassa inoculada nos reatores variou consideravelmente de 0,15 a 3,5 g.L⁻¹ de STV.

Após intensa busca na literatura não foram verificados trabalhos que sugerissem um valor ideal de concentração de biomassa a ser usada como inóculo em estudos de enriquecimento de bactérias ANAMMOX, bem como se constatou que os trabalhos utilizam formas variadas de determinação da biomassa (SSV, peso seco, etc; com unidades distintas e, portanto difíceis de serem comparadas). A seguir, relato de dois exemplos.

No trabalho de Dapena-Mora (2004), os autores usaram um reator gás-lift e um reator em batelada sequencial (RBS) para fazer o enriquecimento de ANAMMOX. Neste trabalho, a concentração inicial de biomassa usada como inóculo foi respectivamente, de 0,36 g.L⁻¹ e 1,5 g.L⁻¹ de SSV. Não obstante, ambos os reatores foram inoculados com lodos que já continham biomassa ANAMMOX (enriquecida previamente em RBS na Universidade Técnica de Delft). Já Third *et al.* (2005) utilizaram 500 ml de lodo ativado (proveniente de um sistema de tratamento convencional), contendo concentração de biomassa de 5,4 g.L⁻¹ de peso seco, para inocular um reator em batelada sequencial de 1 litro.

Tabela 5.1 - Resultado de sólidos totais voláteis do lodo de inóculo

Reator	Volume de lodo inoculado	STV no lodo (g.L ⁻¹)	STV resultante no reator (g.L ⁻¹)
F1	100 mL	35,0	3,50
F2	150 mL	7,40	1,11
F3	200 mL	4,80	0,96
F4	50 mL	3,00	0,15
F5	50 mL	10,00	0,50
F6	50 mL	26,00	1,30

5.2 Avaliação da atividade ANAMMOX nos reatores em batelada F3 e F4 inoculados com lodo ativado

O reator F3 - inoculado com lodo ativado e suplementado com cloranfenicol (Figura 5.1) foi operado sob a condição de batelada alimentada e teve trocas periódicas de meio de cultura.

Conforme apresentado na Figura 5.1A, no início do processo, houve intenso consumo de nitrito, demonstrando intensa atividade de bactérias desnitrificantes presentes no lodo de inóculo. Tal fato também foi observado por Toh *et al.* (2002), onde em cultura inicial em batelada, suplementada com inibidor, o nitrito foi rapidamente consumido sem que houvesse a diminuição de amônia.

A partir do 20º dia o consumo de nitrito passou a ocorrer mais lentamente, indicando que as bactérias desnitrificantes estavam sendo inibidas pelo cloranfenicol. Provavelmente a atividade desnitrificante foi favorecida (pela atmosfera anaeróbia e presença de NO₂⁻), eliminando a matéria orgânica do meio oriunda da lise das bactérias aeróbias (e heterotróficas). Essas, por sua vez, estavam morrendo devido à nova condição do meio no qual se encontravam (meio de cultura autotrófico e anaeróbio), portanto sem fonte de carbono para sobreviverem. Com a morte e lise dessas bactérias houve a liberação de nitrogênio orgânico e quebra deste em nitrogênio amoniacal, fato esse evidenciado pelo aumento da concentração de amônia (efluente) no reator (em relação à concentração afluyente), até o 39º dia (Figura 5.1B). Tal fato também foi observado por Chamchoi e Nitorisavut (2007), onde a concentração de amônia efluente foi maior que a afluyente durante as cinco a sete semanas iniciais de operação do reator.

No 39º dia de operação deste reator, foi feita a primeira troca de 20% do meio de cultura, ou seja, foram retirados 200 mL de meio velho e adicionados 200 mL de meio de cultura

anaeróbio fresco (por meio de seringa sob condições de assepsia). A troca do meio de cultura propiciou uma diminuição na concentração de amônia (por diluição) de $92,4 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ para $81,3 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$. Essas trocas de meio estão evidenciadas na Figura 5.1.B por meio das setas azuis. Não obstante, ao longo dos 28 dias que se seguiram, não foi verificada redução da concentração de amônia. No 57º dia de operação foi feita nova troca do meio de cultura (de 200,0 ml) e nesse mesmo dia aumentou-se a concentração afluenta de nitrito para $48,5 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$. O intuito foi o de aproximar a concentração de nitrito em relação à de amônia para que a proporção amônia: nitrito se aproximasse de 1:1, pois de acordo com Strous *et al.* (1988) a proporção ótima para que ocorra a oxidação anaeróbia de amônia deve ser de 1:1,32. Não obstante, nos 110 dias que se sucederam (a partir do 57º dia), não foi verificado consumo simultâneo de amônia e nitrito, indicando que não ocorreu a remoção de amônia sob condições anaeróbias. Como, em nenhum momento de operação deste reator foi verificado consumo de amônia, este composto não precisou ser adicionado ao reator. Assim, os valores de amônia afluenta apresentados na Figura 5.1B referem-se à concentração de amônia (N-NH_4^+) após cada troca parcial de meio de cultura e não à adição de solução de sulfato de amônio.

A adição de solução de nitrito de sódio 600 mM no reator era constante, a fim de manter a concentração de nitrito dissolvido no meio acima de $2 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. O monitoramento analítico era realizado a cada adição da solução. Os valores referentes à concentração de nitrito (N-NO_2^-) afluenta, observados na Figura 5.1A, para os dias 390 e 408, não representam necessariamente dados de nitrito adicionado ao reator. Nestes dias houve ocorrência de análise de nitrogênio nitroso afluenta sem a troca ou adição de solução concentrada, pois a concentração deste composto ainda estava alta.

Na Figura 5.2, apresenta-se a porcentagem de eficiência de remoção dos compostos nitrogenados (amônia e nitrito). Pode-se verificar que do 1º ao 27º dia de operação deste reator, houve alta eficiência de remoção de nitrito, atingindo valores de 85% na média. Para a amônia ocorreu o oposto, ou seja, os valores foram negativos ou próximos de zero até o 176º dia de operação, evidenciando que houve liberação de amônia no meio, provavelmente devido a morte e lise celular. Conforme comentado anteriormente, neste dia foi então feita uma troca parcial do meio de cultivo, objetivando a redução na concentração de amônia dentro do reator. A partir desta data até o 43º dia, verificou-se uma drástica redução no consumo de nitrito, causado provavelmente pela presença do cloranfenicol, que inibiu a flora desnitrificante, elevando-se gradativamente até o 57º dia de operação do reator, quando atingiu 90% de

eficiência de remoção do nitrito. Dentro do mesmo período, a eficiência de remoção de amônia foi muito baixa, não tendo sido maior que 10% em média. Segundo Toh *et al.*, 2002, observou-se que entre os inibidores utilizados, apenas o cloranfenicol reprimiu a desnitrificação, sem inibição simultânea da redução de nitrito e remoção de amônia.

Não obstante, até o dia 135 (a partir do 57º dia), não houve consumo simultâneo de nitrito e amônia, apesar do aumento gradativo na remoção do nitrito (variação de 3 a 46%). Entretanto, no período compreendido entre o 139º dia de operação até o 350º dia, houve intenso consumo de nitrito, apesar da tentativa de inibir as desnitrificantes pela adição do cloranfenicol.

A remoção de amônia no período compreendido entre o 176º dia de operação até o 264º dia apresentou dados inconstantes, porém houve consumo gradativo neste intervalo, atingindo valores em torno de 25 a 30% de eficiência de remoção (conforme Figura 5.2).

A partir do 353º dia, o reator F3 passou a ser alimentado com $70 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ (e não mais nitrito), objetivando diminuir a competição das desnitrificantes com as ANAMMOX pelo mesmo aceptor final de elétrons, já que as desnitrificantes devem usar o nitrato e reduzi-lo a nitrito, dando chance ao desenvolvimento e enriquecimento das ANAMMOX. Nestes 49 dias em que se manteve o nitrato no reator, observou-se consumo total deste nos 15 primeiros dias e um período de 23 dias com consumo parcial do mesmo, até estagnação em torno de 30% na eficiência da remoção. Nos dias restantes do reator (até o 430º dia), verificou-se remoção intensa do nitrito, quando então decidiu-se pela interrupção na operação deste reator.

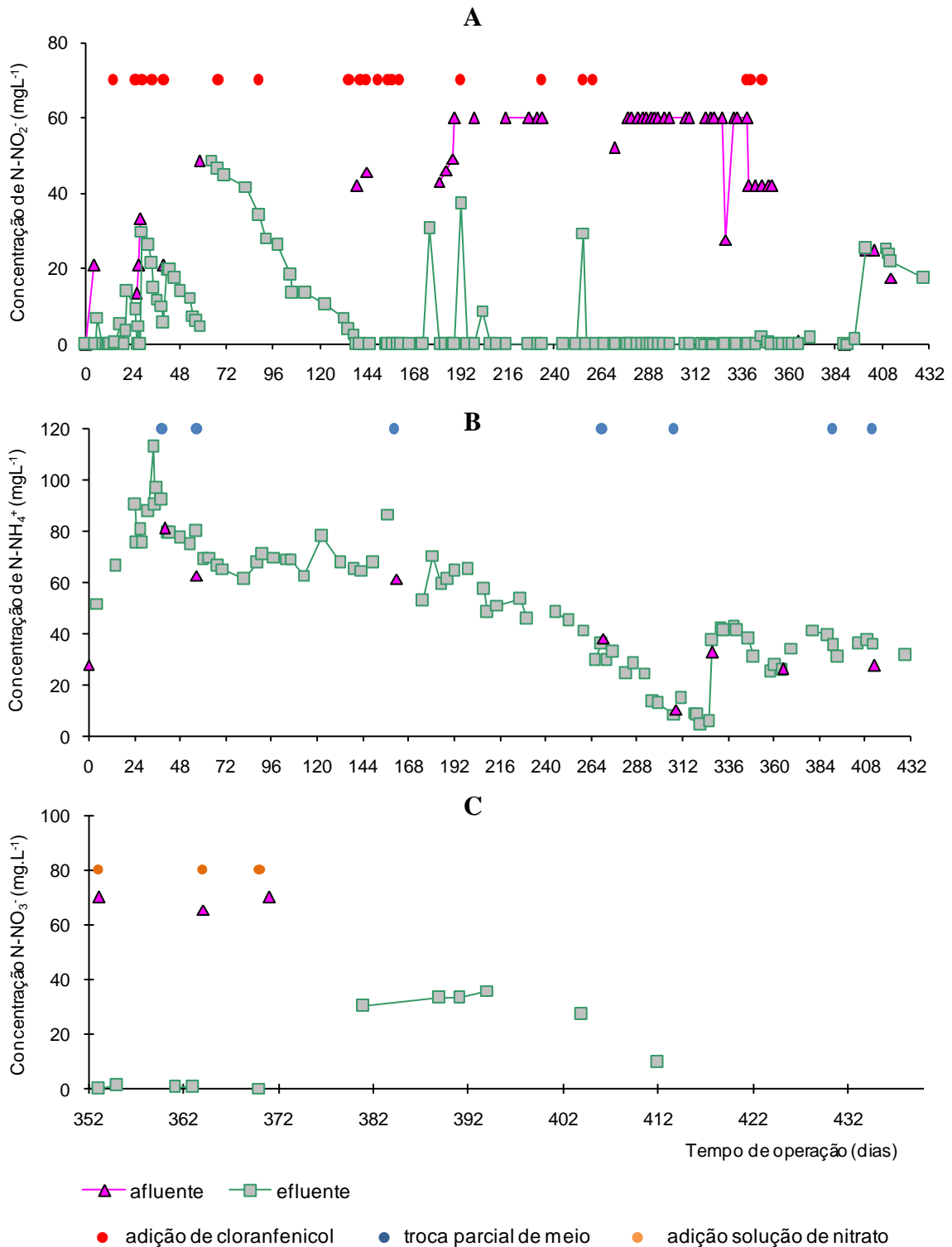


Figura 5.1 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F3 ao longo dos 430 dias de operação. A) Perfil de remoção de nitrito ($\text{mg N-NO}_2.\text{L}^{-1}$). No gráfico A, os marcadores em vermelho correspondem aos dias de adição de cloranfenicol ao reator. B) Perfil de remoção de amônia ($\text{mg N-NH}_4.\text{L}^{-1}$). No gráfico B, os marcadores em azul correspondem aos dias de troca parcial de meio de cultura no reator. C) Perfil de remoção de nitrato ($\text{mg N-NO}_3.\text{L}^{-1}$). No gráfico C, os marcadores em laranja correspondem aos dias de adição de solução de nitrato ao reator.

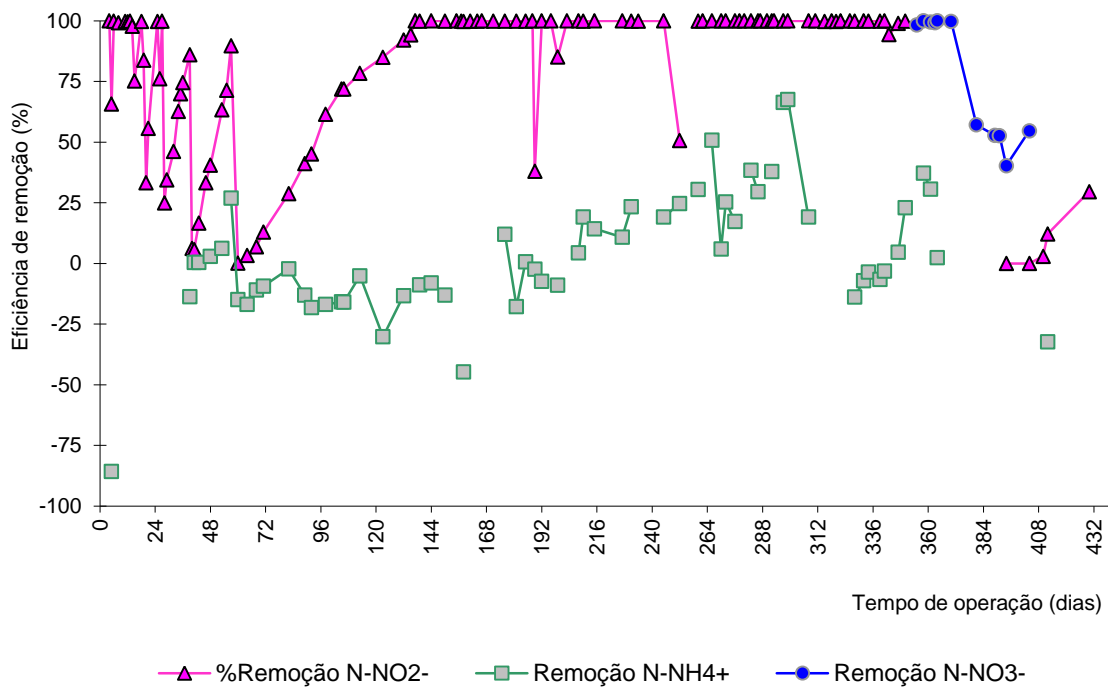


Figura 5.2 - Eficiência de remoção de amônia e nitrito pelo lodo cultivado no reator F3 ao longo do tempo de operação.

O reator F4 (com lodo ativado, sem a adição de cloranfenicol) foi montado com o objetivo de comparar o comportamento deste reator com o do F3, sendo também operado em modo batelada alimentada. Conforme pode ser verificado na Figura 5.3, ao longo dos 80 dias de operação deste reator, o nitrito foi consumido lentamente, porém a amônia não. Pelo contrário, o valor deste composto aumentou em relação à concentração afluente, sugerindo a ocorrência de morte celular e liberação de nitrogênio orgânico, conforme explicação detalhada acima para o reator F3.

Do 59º ao 257º dia de operação, observou-se pouca alteração na concentração de nitrito dentro do reator, mesmo após as trocas parciais de meio, tendo sido determinado um valor médio de $23,0 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. Considerando que o reator foi inoculado com concentração de $28,0 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, os valores obtidos neste período representaram eficiência de remoção de nitrito em torno de 18%. Em relação ao teor de amônia no mesmo período, observou-se que a média da concentração obtida foi em torno de $49,0 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, com ocorrência de picos no valor máximo de $63,6 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$. Considerando que o reator foi inoculado com $28,0 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, este valor médio obtido durante estes 198 dias de operação representou cerca de um aumento em mais de 100% no teor interno de amônia do reator. A amônia não foi consumida ao longo dos 257 dias de operação e, portanto, como não houve atividade ANAMMOX neste reator (que seria evidenciada pelo consumo simultâneo de amônia e de

nitrito), o mesmo foi descartado após esse período. Ressalta-se que o reator F4 apresentou o menor valor de biomassa inoculada no meio de cultura, e isso pode justificar o menor consumo de nitrito e de amônia ao longo do processo, quando comparado com o reator F3. Quanto ao comportamento da amônia, observou-se ao longo de todo período de operação que houve em média uma eficiência de remoção em torno de 20%. Não houve adição de NO_3^- neste reator.

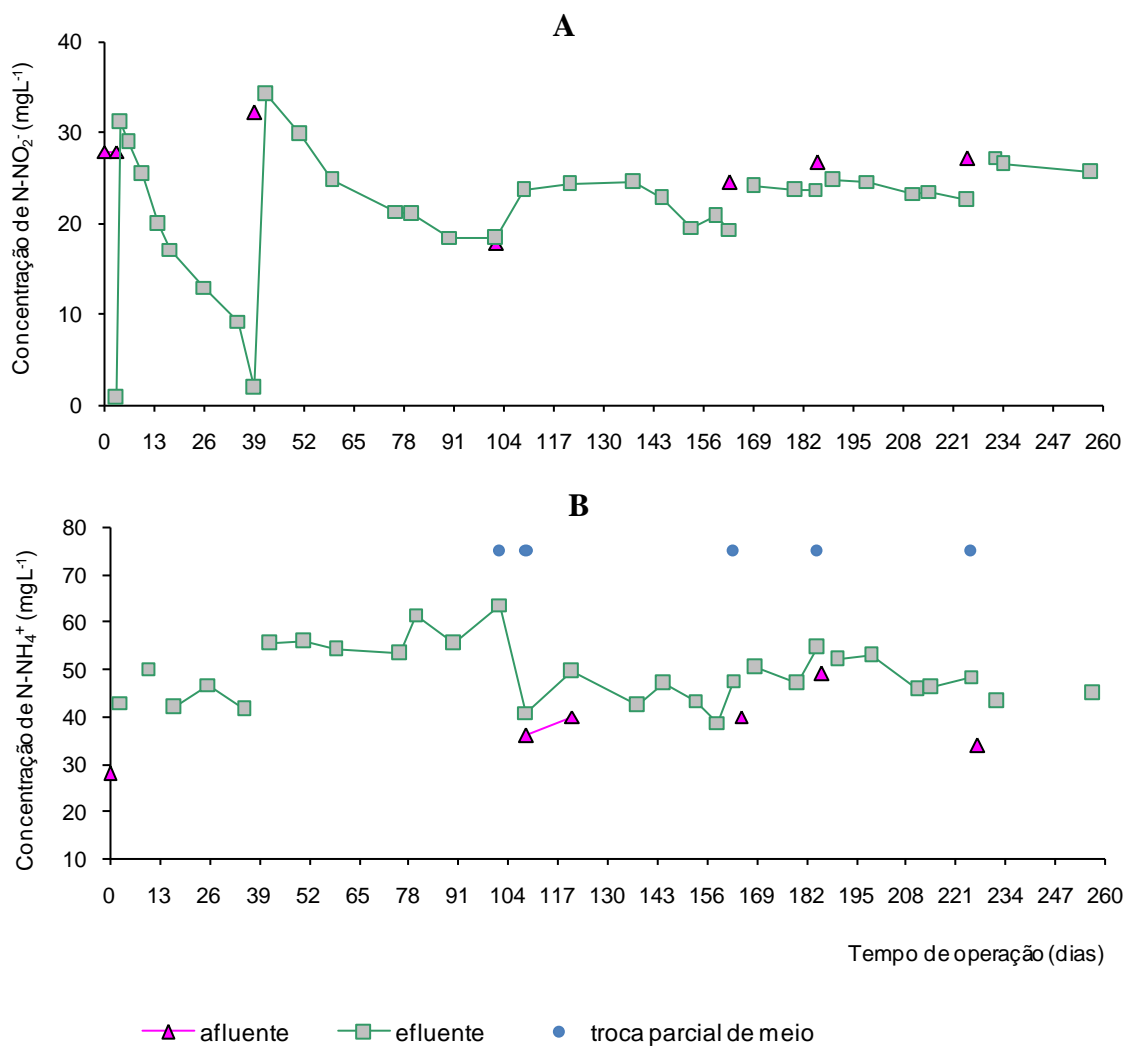


Figura 5.3 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F4 ao longo dos 257 dias de operação. **A)** Perfil de remoção de nitrito ($\text{mg N-NO}_2\cdot\text{L}^{-1}$). **B)** Perfil de remoção de amônia ($\text{mg N-NH}_4\cdot\text{L}^{-1}$). No gráfico B, os marcadores em azul correspondem aos dias de troca parcial de meio de cultura no reator.

5.3 Avaliação da atividade ANAMMOX nos reatores em batelada F5 e F6 inoculados com lodo anaeróbio

O reator F5 foi operado em modo batelada sem o uso de cloranfenicol e objetivou uma comparação com o reator F6 operado também com lodo de UASB, porém com a adição de cloranfenicol. O processo ao longo de sua operação visto na Figura 5.3, teve um número menor de trocas parciais de meio velho por meio novo. Este reator apresentou comportamento semelhante ao reator F4, ou seja, houve consumo gradativo do nitrito sem redução da amônia. Observou-se ao longo do período de operação do reator F8 que, mesmo após as tocas parciais, houve aumento de amônia e certa estagnação nos teores internos de nitrito, dando indícios de que a biomassa ANAMMOX não estava se desenvolvendo e de que as desnitrificantes estavam diminuindo sua atividade e posteriormente morreram.

Os picos no teor de nitrito observados nos dias 6 (com $71 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$) e 10 (com $72 \text{ mg.L}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$) ocorreu devido um erro no cálculo analítico de nitrito, ocasionando uma dosagem incorreta no volume de solução NaNO_2 600 mM adicionada ao reator. Após este fato, evidenciou-se uma forte e constante queda na concentração de nitrito entre os dias 17 e 98, mas a concentração de amônia não apresentou a mesma curva, isto é, não houve consumo concomitante de nitrito e amônia.

A comparação dos dois gráficos (Figura 5.4A e 5.4B) evidencia que houve consumo gradativo do nitrito sem que houvesse remoção da amônia. Portanto, após 231 dias de operação, como não houve indício de atividade ANAMMOX, este reator foi descartado. Não ficou evidenciada uma atividade intensa da flora desnitrificante, conforme ocorrido no reator de lodos ativado (reator F3).

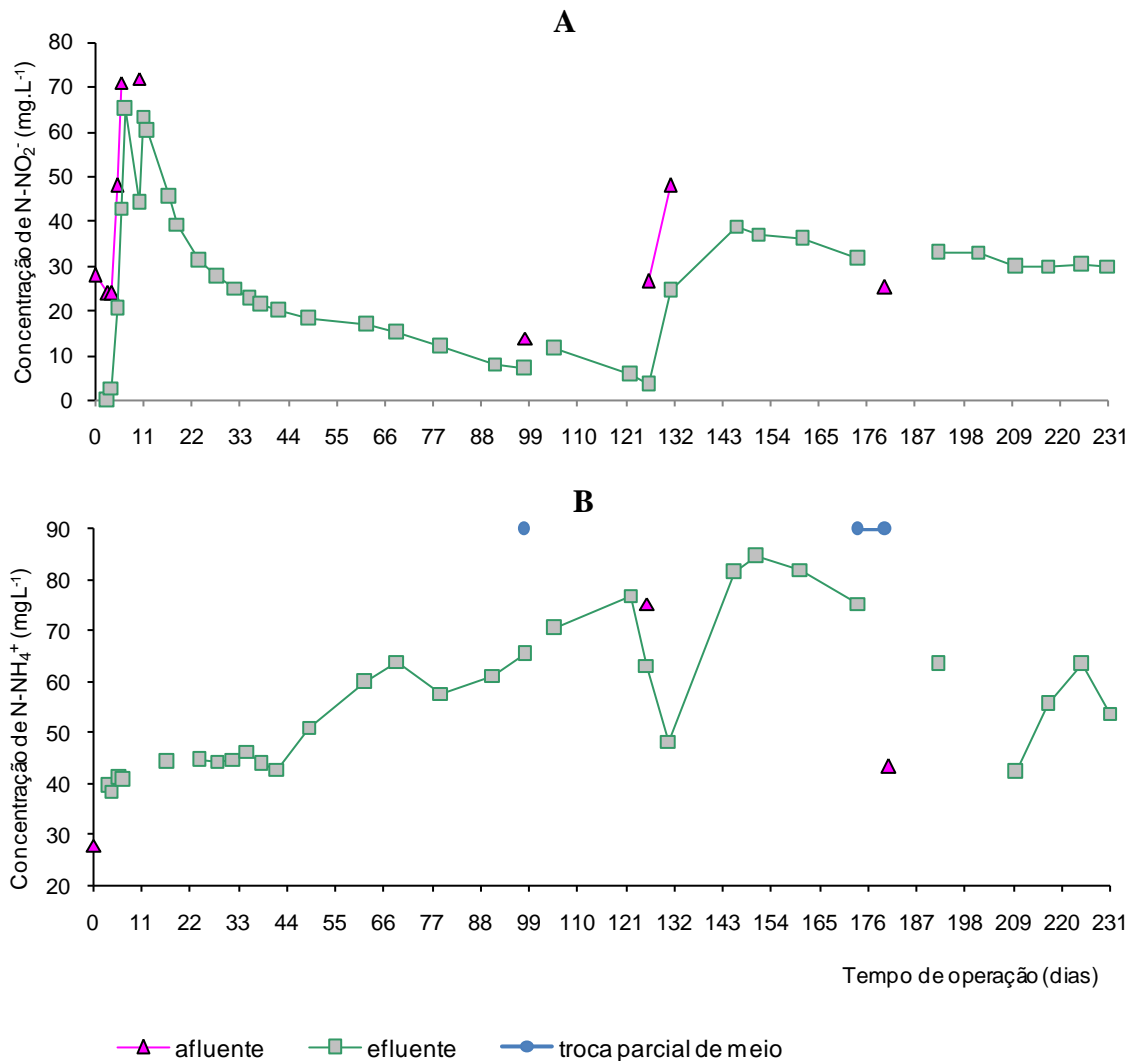


Figura 5.4 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F5 ao longo de 230 dias de operação. **A)** Concentração de nitrito afluente e efluente. **B)** Concentração de amônia afluente e efluente. As setas azuis correspondem aos dias de trocas parciais de meio de cultura no reator.

Com relação ao perfil de remoção dos compostos nitrogenados no reator F6 (Figura 5.5), verificou-se que ao longo dos 100 dias iniciais de operação o nitrito foi sempre consumido (Figura 5.5A), ainda que mais lentamente, pelo fato do cloranfenicol ter inibido em parte a atividade das bactérias desnitrificantes. Não obstante, neste mesmo período foi observado aumento exagerado da concentração de amônia efluente (Figura 5.5B). Este aumento indicou provável morte celular, liberação e quebra de nitrogênio orgânico em amônia no meio (conforme discutido anteriormente para o reator F5). No 91º dia de operação do reator a concentração efluente de amônia apresentou resultado acima de 200 mg.L⁻¹. Fez-se, então,

outra troca parcial de meio no dia 93, reduzindo em 60% a concentração de amônia após três dias (por efeito da diluição do meio).

No 103º dia de operação do reator F6, observou-se que a relação estequiométrica NH_4^+ e NO_2^- não mantinha a proporcionalidade próxima a 1:1, conforme proposto inicialmente no experimento. Como estratégia de correção, providenciou-se a adição de solução de NaNO_2 600 mM, objetivando aumentar a concentração de nitrito afluyente para 60 mg.L^{-1} . Este valor foi definido, pois vários autores alertaram para o fato do nitrito em concentrações altas (acima de 120 mg.L^{-1}) ser tóxico para as bactérias ANAMMOX (STROUS, 1998; JETTEN *et al.*, 1999). A partir do 119º dia de operação, após aumento da concentração de nitrito afluyente, ocorreu consumo intenso deste composto, o que demandou uma série de adições de solução concentrada de nitrito de sódio. Nessa fase, especificamente durante os dias 158 ao 207, verificou-se remoção de 39,3% na concentração de amônia (de 72,5 mg.L^{-1} para 44,0 mg.L^{-1}), o que poderia indicar ser o início de atividade ANAMMOX, já que neste mesmo período o nitrito foi prontamente consumido. Após esse período, e por cerca de 63 dias não foi verificado consumo de amônia. Não obstante, no período seguinte, compreendido entre o 270º ao 334º dia de operação do reator, foi observada novamente redução de 40,4% na concentração de amônia (de 53,0 mg.L^{-1} para 31,6 mg.L^{-1}). Como o nitrito continuou sendo consumido rapidamente (indicando que as desnitrificantes continuavam ativas), a partir do 286º dia de operação, o reator passou a ser alimentado com nitrato (e não mais com nitrito). Durante este período, foi observado que houve tanto redução como uma elevação na remoção do nitrito, porém sem que a amônia estivesse sendo removida simultaneamente.

Apesar de ter sido verificado consumo de amônia neste reator em dois períodos distintos, este consumo está muito distante da estequiometria da reação ANAMMOX proposta por Strous (1998), que é de 1,32 mol de nitrito para cada 1 mol de amônia. Quando se calculou essa relação para o período compreendido entre os dias 158 até o 207, verificou-se que para 30 $\text{mg N-NH}_4.\text{L}^{-1}$ removidos, foram consumidos 420 $\text{mg de N-NO}_2^-. \text{L}^{-1}$, indicando uma relação ($\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$) de 14. Portanto, evidenciando ainda intensa atividade desnitrificante, apesar do ligeiro consumo de amônia. Assim, diante desta conclusão e tendo operado o reator por quase 1 ano, optou-se pela descontinuação do mesmo.

Ainda, em relação ao reator F6, foi observada a ocorrência de odor sugestivo de sulfeto de hidrogênio em alguns momentos da operação, especificamente em dias isolados dos meses de abril e maio de 2008 (237º ao 289º dias de operação). Tal fato não foi completamente analisado, pois o reator era muito manipulado semanalmente para ajuste de pH e análises,

dificultando a coleta de gás para análise e quantificação. O processo de monitoramento do reator provocava uma constante alteração na composição dos gases mantidos na atmosfera do frasco, devido à adição de gás argônio após as manipulações no reator. Uma explicação provável para o evento pode estar associada a uma reação química interna ocorrida, uma vez que este reator necessitou de várias adições de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) para ajuste de pH. A possibilidade de desenvolvimento de uma biomassa sulfato redutora chegou a ser discutida como provável causa, porém, o fato não foi pesquisado e o evento desapareceu à medida que se faziam trocas parciais de meio de cultura velho por meio novo foram realizadas.

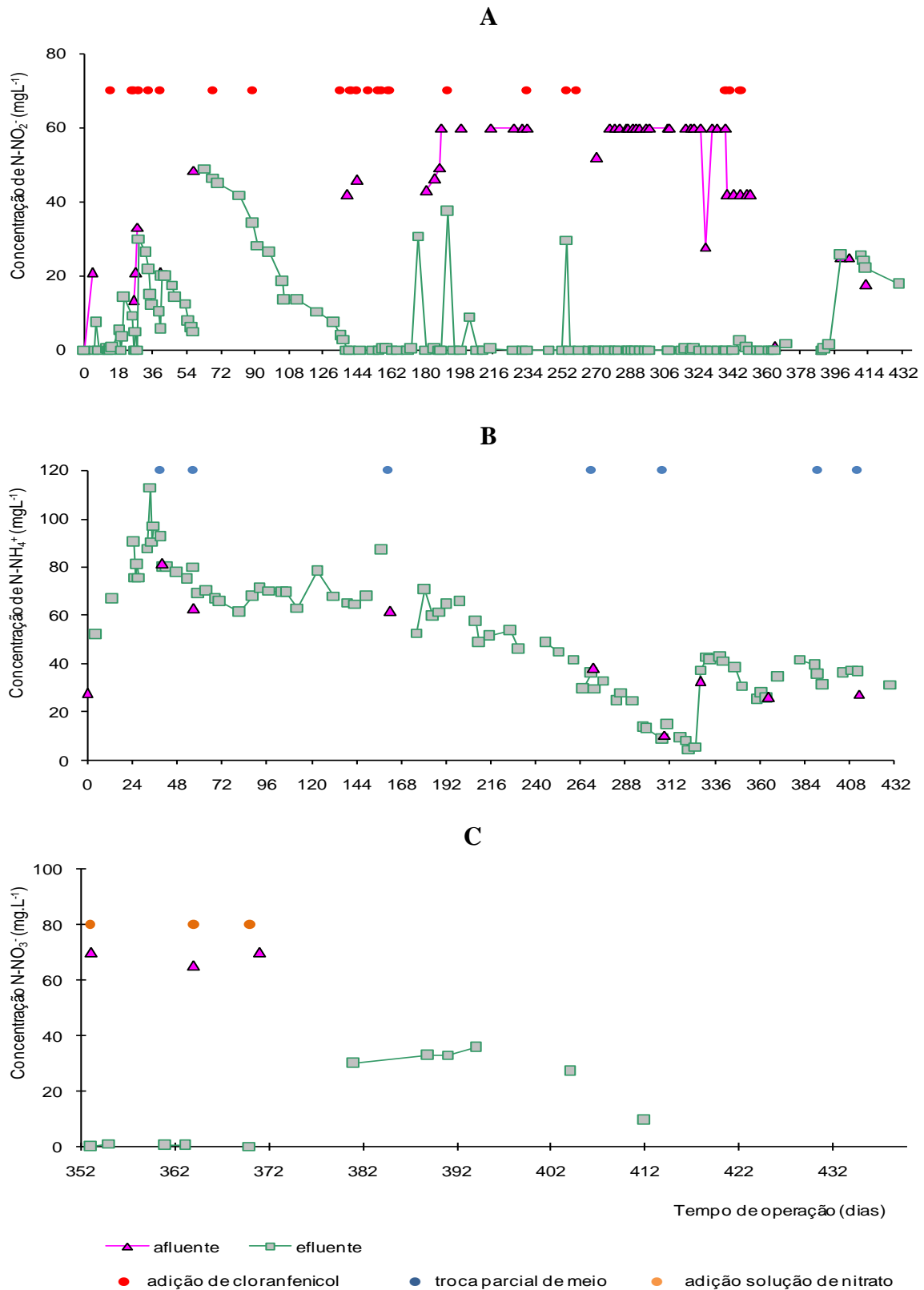


Figura 5.5 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F6. A) Perfil de remoção de nitrito (mg N-NO₂.L⁻¹). Neste gráfico, os marcadores em vermelho correspondem aos dias de adição de cloranfenicol ao reator. B) Perfil de remoção de amônia (mg N-NH₄.L⁻¹). No gráfico B, os marcadores em azul correspondem aos dias de troca parcial de meio de cultura no reator. C) Perfil de remoção de nitrato (mg N-NO₃.L⁻¹). No gráfico C, os marcadores laranja correspondem aos dias de adição de solução de nitrato ao reator.

5.4 Avaliação da atividade ANAMMOX nos reatores em batelada sequencial F1 e F2 inoculados com lodo anaeróbio

Os reatores F1 e F2, operados em batelada sequencial (sem a adição de cloranfenicol), foram os primeiros reatores a serem operados durante esse trabalho, objetivando uma estratégia de enriquecimento de ANAMMOX a partir de trocas mais frequentes de meio de cultura.

O reator F1 foi operado como sistema em batelada nos 34 dias iniciais. Nesse período, conforme apresentado na Figura 5.6A, verificou-se que o nitrito foi prontamente consumido e, portanto, a cada 24 horas, mais nitrito era adicionado (por meio de solução de NaNO_2 600mM). Esse consumo imediato de nitrito provavelmente ocorreu por parte das bactérias desnitrificantes presentes nesse lodo, já que, como pode ser verificado na Figura 5.6 A e B, não houve consumo simultâneo de amônia, portanto, indicando que não tinha atividade ANAMMOX. Pode-se verificar ainda (Figura 5.6B), que neste mesmo período, a concentração de amônia aumentou muito de 28 mg N-NH $_4$.L $^{-1}$ (que era a concentração inicial no meio de cultura) para 254,3 mg N-NH $_4$.L $^{-1}$. Como já discutido anteriormente para os outros reatores, o aumento da amônia deve ter sido consequência da morte celular, o que causou liberação do nitrogênio orgânico, contribuindo para o aumento da concentração de amônia no meio.

Após esse período inicial, o reator passou a ser operado como batelada sequencial, ou seja, todos os dias eram retirados 200 mL de meio de cultura (velho), e adicionava-se 200 mL de meio de cultura fresco, portanto, a cada 24 horas um quinto do volume do reator era trocado. Essa troca diária de meio aconteceu por 54 dias (até o 84º dia de operação) quando então passou a ser feita a cada 48 ou 72 horas. Essa troca foi importante para diminuir a concentração de amônia presente no reator (por diluição), e assim permitir que as substâncias oriundas da lise celular fossem retiradas do sistema. Tal fato permitiu a diminuição da atividade desnitrificante, num primeiro momento (Figura 5.6A de 34 a 52 dias) e depois a eliminação desta atividade, já que a remoção de nitrito deixou de acontecer.

No período compreendido entre o 109º e o 145º dia de operação, foram adicionadas 1,0 ml de hidrazina (N_2H_4) (concentração final de 0,1mM) e 1,0 ml de hidroxilamina (NH_2OH) (concentração final de 0,1mM), respectivamente, a cada 48 horas. O objetivo da adição desses dois compostos foi que como eles são intermediários na reação ANAMMOX, poderiam contribuir para acelerar o início da reação. As concentrações escolhidas foram iguais às aquelas usadas por Third *et al.*, (2005). Durante essa fase de operação como batelada sequencial, que durou no total 357 dias, o reator foi operado com concentrações de amônia e nitrito afluentes

em torno de $35,0 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{L}^{-1}$ e $32,0 \text{ mg de N-NO}_2^- \text{L}^{-1}$, respectivamente, porém oscilações para mais e para menos nesses valores aconteceram algumas vezes (conforme verificado nas Figuras 5.6.A e 5.6.B). Durante os onze meses de operação do sistema como batelada sequencial, verificou-se que as concentrações afluente de amônia e nitrito foram praticamente iguais às concentrações efluente, indicando que não houve remoção desses compostos. Portanto, após 12 meses de incubação do lodo nas condições específicas para o crescimento das ANAMMOX (meio mineral autotrófico e condições anaeróbias), não foi verificada atividade ANAMMOX e, portanto, não foi possível enriquecer essas bactérias.

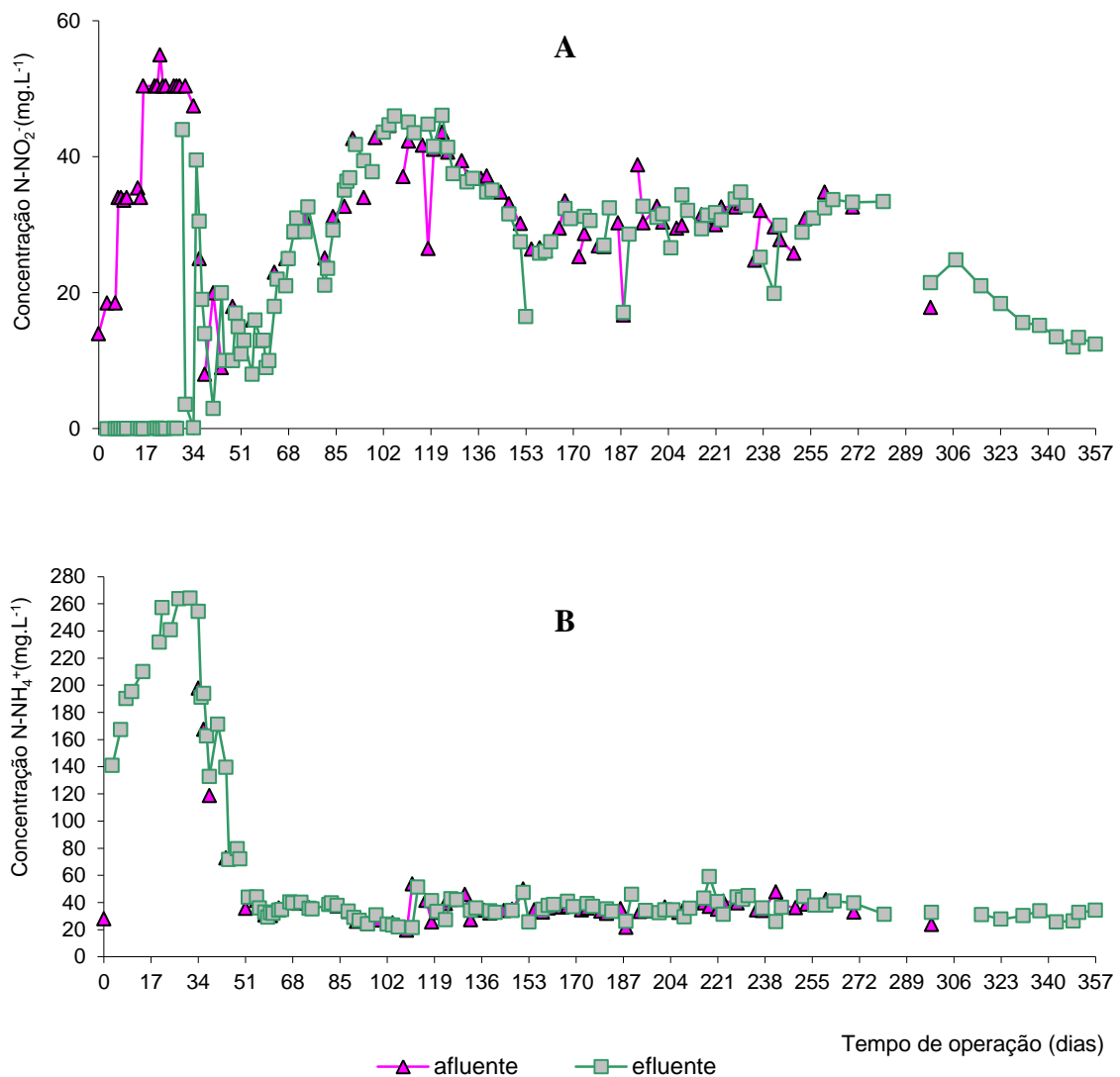


Figura 5.6 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F1. A) Perfil de remoção de nitrito ($\text{mg N-NO}_2^- \text{L}^{-1}$). B) Perfil de remoção de amônia ($\text{mg N-NH}_4^+ \text{L}^{-1}$).

Na Figura 5.7, são apresentados os resultados do perfil de remoção de amônia e de nitrito para o reator F2. O reator F2 foi montado com o intuito de servir de comparação ao reator F1, pois

foi também operado como batelada sequencial, porém, sem a fase inicial de 34 dias em batelada. Pode-se verificar que nos 16 dias iniciais de operação, o nitrito foi consumido imediatamente (sendo necessário adicionar mais nitrito a cada 24 horas) (Figura 5.7A), o mesmo não aconteceu com a amônia (Figura 5.7B), indicando, portanto, existência de atividade desnitrificante. Não obstante, com a troca periódica de meio de cultura, após essa fase inicial, não foi mais verificada remoção de nitrito, indicando que a atividade desnitrificante cessou. Esta população deve ter sido eliminada, pois como o meio de cultura era autotrófico, não tinha fonte de carbono ou substratos para suportar seu crescimento. A partir do 50º dia de operação, a concentração de nitrito afluente foi aumentando gradativamente, mas esse nitrito não foi consumido e praticamente o que entrava, saía do reator (Figura 5.7A). O mesmo aconteceu com a amônia, ao longo de todo tempo de operação do reator (cerca de 243 dias). Assim como no reator F1, neste também foram adicionados 1,0 ml de hidrazina (a partir do 80º dia) e 1,0 ml de hidroxilamina (a partir do 118º dia) a cada 48 horas, com o intuito de ajudar (e tentar acelerar) a ocorrência da reação ANAMMOX. Como não foi observada remoção concomitante dos compostos nitrogenados durante o tempo de incubação, esse reator foi descontinuado.

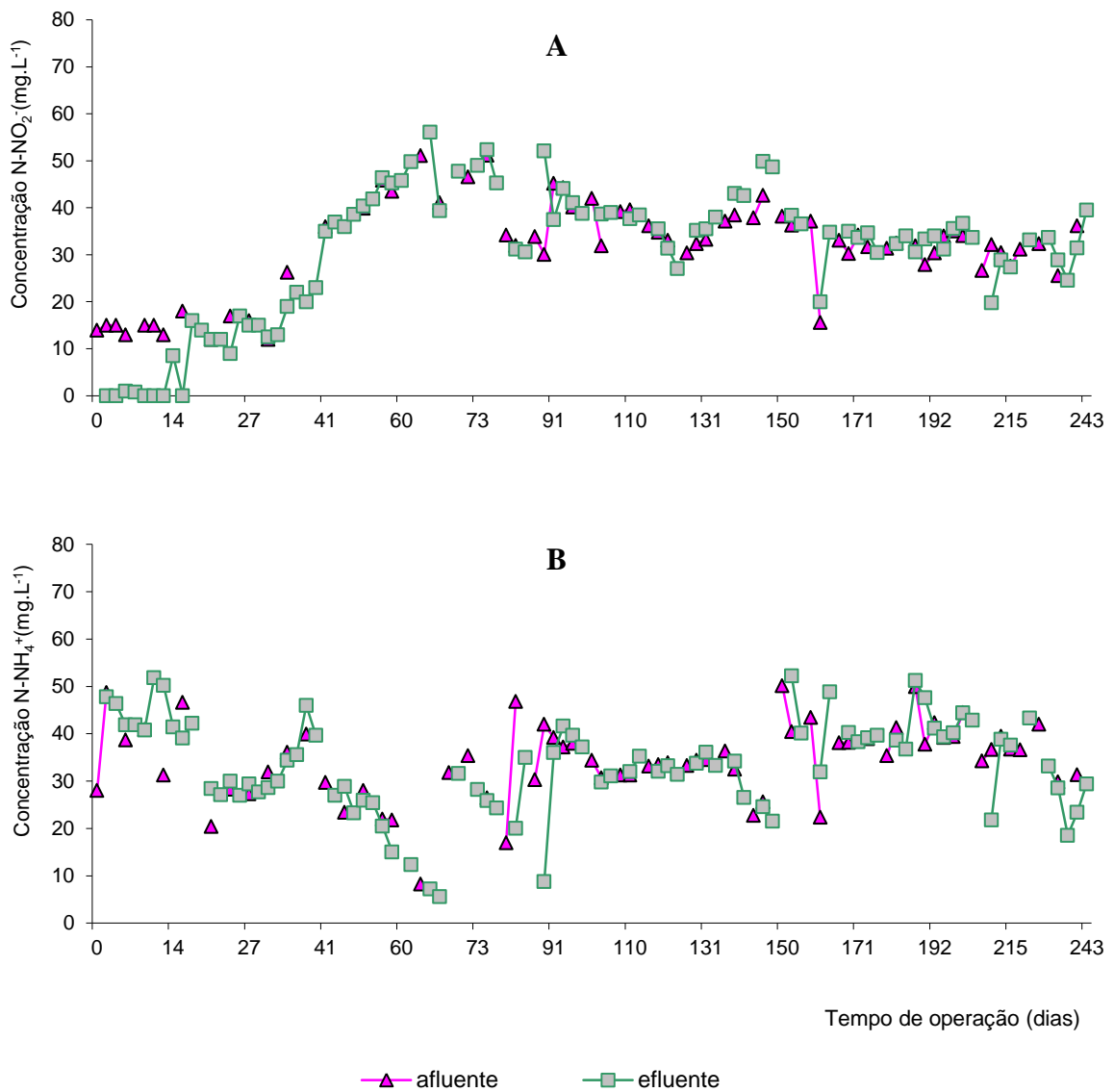


Figura 5.7 - Perfil de remoção dos compostos nitrogenados do reator F2. A) Perfil de remoção de nitrito (mg N-NO₂.L⁻¹). B) Perfil de remoção de amônia (mg N-NH₄.L⁻¹).

É interessante ressaltar que os reatores F5 e F6 apresentaram variações no pH (Figura 5.8) dentro da faixa ideal de operação, não demandando adições constantes de solução ácida para ajuste.

A linha de tendência linear da variação do pH (em vermelho) apresentada nos gráficos das Figuras 5.8 A e 5.8 B, objetivaram mostrar que, o aumento nos teores de amônia do reator F1 observados nos primeiros 34 dias de operação do reator, levaram a um aumento no pH do meio comparado ao reator F2.

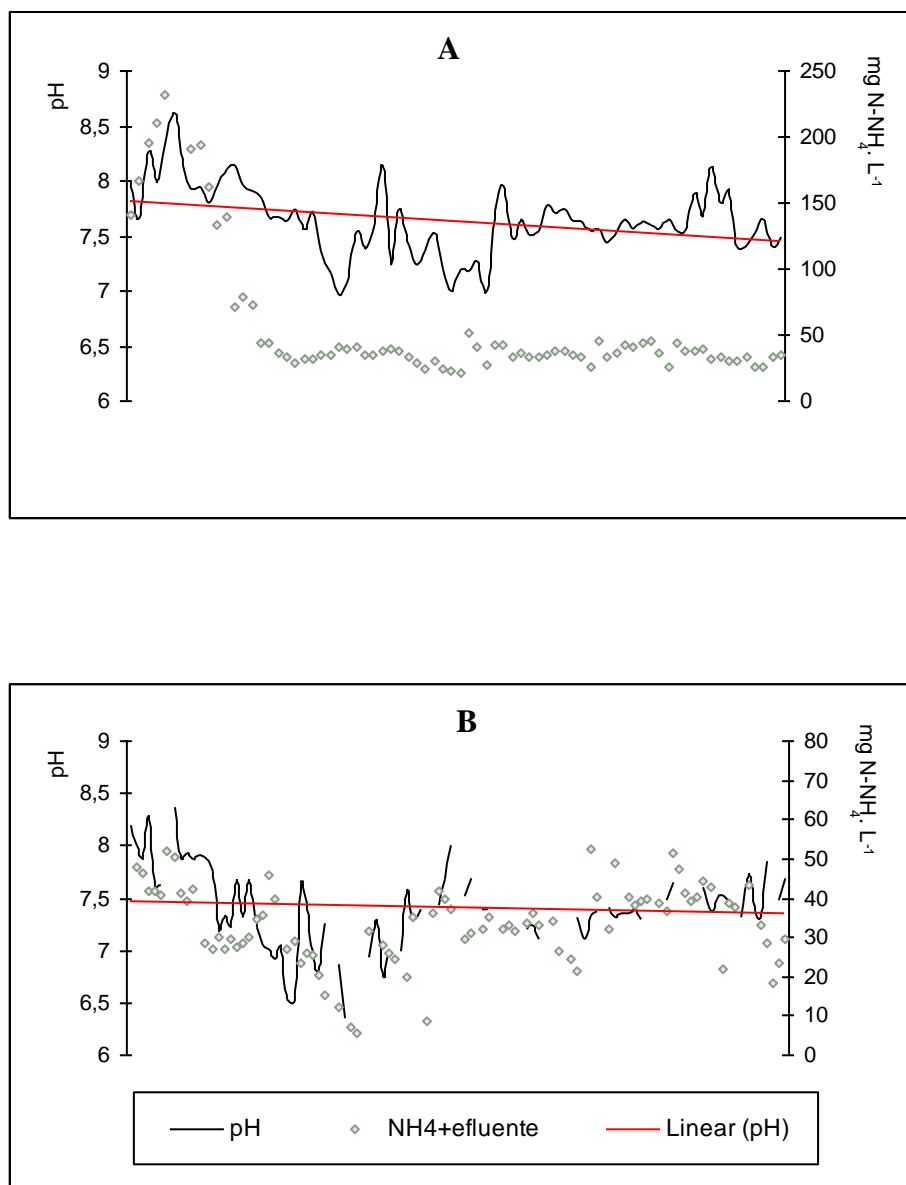


Figura 5.8 - Perfil do pH dos reatores F1 e F2 ao longo do período de operação, em função da concentração de amônia efluente. **A)** Perfil do pH do reator F5. **B)** Perfil do pH do reator F6. A linha contínua vermelha representa a linha de tendência linear da variação do pH de cada reator.

O monitoramento do pH foi realizado para todos os reatores ao longo dos dias de operação de cada um. Os valores obtidos (dados não apresentados dos reatores F3, F4, F5 e F6) tiveram pequena variação, sendo ajustados para a faixa ideal de 7,0 a 8,0, com pH 7,5 considerado valor ótimo de trabalho. Houve ocorrências de pH abaixo de pH 7,0 no reator F2 (45°, 62° e 73° dias) que coincidiram com decréscimos no valor da amônia. Tal parâmetro era ajustado imediatamente e monitorado a cada 24 horas. Observou-se que sempre que havia completa depleção de nitrito e/ou aumento nos teores de amônia, o pH do reator atingia valores acima da faixa ideal de trabalho, demandando a adição de solução ácida.

5.5 Resultado do reator controle (usado sem biomassa)

O reator controle (Fc), contendo somente o meio mineral autotrófico (sem biomassa) foi operado por 162 dias. Pode-se verificar na Figura 5.9 que não houve consumo de nitrito, tampouco de amônia ao longo do tempo, indicando que não existiram reações químicas (fatores abióticos como temperatura, pH, luz) que pudessem alterar a concentração de amônia e nitrito neste frasco. Portanto, não houve degradação dos compostos nitrogenados por fatores abióticos. Não obstante, nos 40 dias iniciais de incubação verificaram-se oscilações nos valores de amônia. O método de análise colorimétrico usado para a quantificação da amônia apresentou uma faixa de variação de 5 a 10% (conforme dados verificados em laboratório com meios de cultura recém preparados). Assim estas oscilações estariam um pouco acima da faixa de variação do método, mas de qualquer forma pode-se constatar que não houve desaparecimento da amônia. Portanto, o consumo de nitrito, e, em menor proporção, de amônia verificado nos demais reatores (F1, F2, F3, F4, F5 e F6) foi decorrente de consumo biológico devido à presença do inóculo.

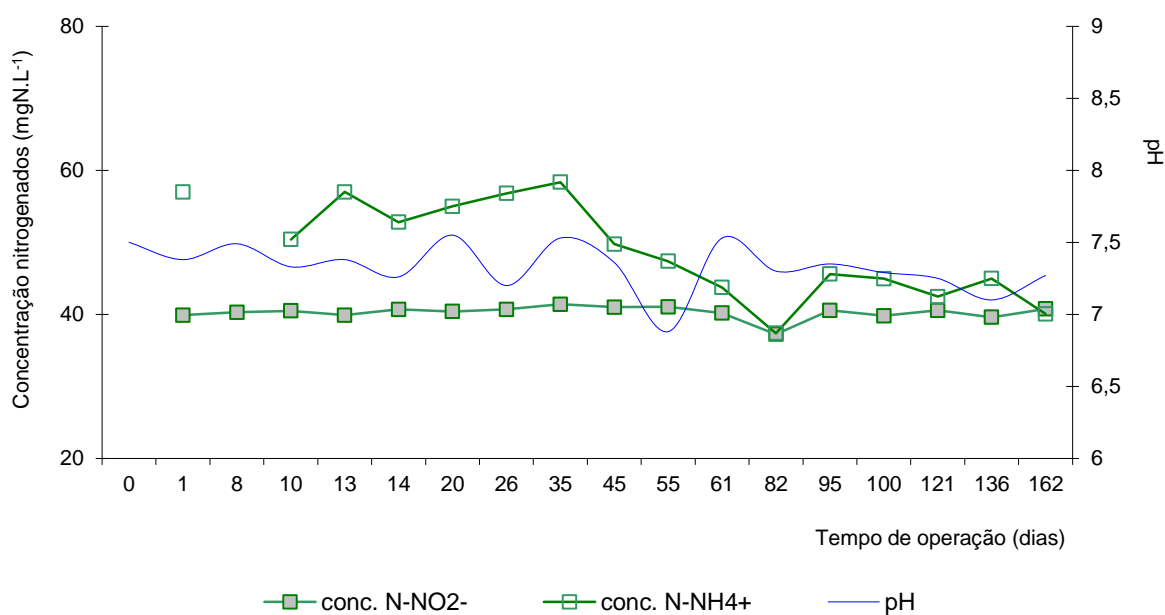


Figura 5.9 - Monitoramento da concentração de nitrito e amônia no meio de cultura do reator controle (Fc). A linha contínua azul representa a variação do pH ao longo do período de operação do reator.

5.6 Resultados da análise de hibridação “in situ” com sondas fluorescentes (FISH) com a sonda Amx820

As amostras de lodo de UASB (coletadas em janeiro e março de 2007) e de lodo ativado (coletadas em abril e julho de 2007) que serviram de inóculo para os reatores usados no enriquecimento das ANAMMOX, foram analisadas pelo FISH. O objetivo foi o de investigar a presença de ANAMMOX, especificamente *Brocadia anammoxidans* e *Kuenenia stuttgartiensis* (devido à aplicação e especificidade da sonda Amx820) nestes inóculos. Os resultados foram negativos para todas essas amostras, ou seja, não foram detectadas células de bactérias ANAMMOX nestes lodos, indicando que elas não estavam presentes, ou poderiam estar, mas em quantidade abaixo do limite de detecção da técnica (que é de 10^3 a 10^4 células/mL).

Para os reatores foram analisadas algumas amostras nos diferentes tempos de operação, conforme pode ser verificado na Tabela 5.2 e os resultados também foram negativos.

Tabela 5.2 - Resultados da técnica de FISH de amostras dos reatores em diferentes tempos de operação

Reator amostrado	Data da retirada de amostra	Resultado do FISH
F1	167 dias de operação	Negativo
F2	138 dias de operação	Negativo
F3	97 dias de operação	Negativo
F5	61 dias de operação	Negativo
F6	26 dias de operação	Negativo

Pela Tabela 5.2, nota-se que não foi feita análise da biomassa do reator F4 pela técnica de FISH, devido a ausência de indícios físico-químicos (consumo simultâneo de nitrito e amônia) de enriquecimento de ANAMMOX neste reator e em função dos resultados negativos do FISH, obtidos até então nos demais reatores, já que este foi o último reator a ser montado.

Tsushima *et al.* (2007) usaram a técnica de FISH (com a sonda Amx 820) na biomassa dos reatores utilizados no enriquecimento de ANAMMOX. Os resultados do FISH foram negativos até o 350º dia de incubação, indicando que as ANAMMOX estavam abaixo do limite de detecção da técnica. Não obstante, verificaram sinal positivo após 380 e 410 dias de cultivo com a sonda, sendo que foi possível fazer a contagem do número de células

hibridadas. Foi estimado que a abundância das ANAMMOX foi de $1,2 \times 10^6$ e $3,3 \times 10^7$ células/mL de lodo, respectivamente nos dias 380 e 410, e esses valores corresponderam a cerca de 2% e 36% do total de células coradas com DAPI.

5.7 Resumo dos resultados obtidos nos enriquecimentos e comparação com outros Trabalhos

Na Tabela 5.3 são apresentados os resultados obtidos no presente estudo de acordo com a atividade metabólica identificada em cada reator, em função do monitoramento dos compostos nitrogenados amônia e nitrito. Pode-se verificar que em todos os reatores o processo verificado ao longo do tempo de incubação foi o de desnitrificação, independente do tipo e da concentração de inóculo usado. O tempo de duração desta atividade desnitrificante variou para cada reator. Nos reatores F3 e F6, que foram suplementados com cloranfenicol, em alguns momentos foi possível diminuir esta atividade, mas não eliminá-la completamente.

Este processo deve ter sido favorecido pelas condições em batelada existente nos reatores, que permitiu com que as bactérias heterotróficas presentes no lodo conseguissem sobreviver durante todo o processo, pois apesar do meio ser desprovido de fonte de carbono, estas bactérias conseguem viver dos compostos oriundos da lise celular das outras bactérias (chamado crescimento críptico) mesmo em ausência de oxigênio, além de poderem utilizar tanto o nitrito como o nitrato como aceptor de elétrons. Tal fato também foi verificado por Dapena-Mora *et al.* (2004). Nos reatores F1 e F2 operados sob condição batelada sequencial, verificou-se que houve desnitrificação, porém num período muito curto e no início da operação dos reatores, evidenciando que a troca periódica de meio foi importante para eliminar esta atividade. Não obstante, não foi observada atividade ANAMMOX, e, portanto, não foi possível enriquecer as bactérias ANAMMOX também nestes reatores.

Tabela 5.3 - Resumo dos experimentos realizados e atividades metabólicas verificadas nos reatores a partir das variações nos compostos nitrogenados

Reator	Inoculo usado	Concentração de STV no enriquecimento (g.L ⁻¹)	Amônia	Nitrito	Modo de Operação	Metabolismo identificado
F1	Lodo anaeróbio	3,5	0	↓	Batelada Sequencial	Desnitrificação (somente nos 34 dias iniciais)
F2	Lodo anaeróbio	1,11	0	↓	Batelada Sequencial	Desnitrificação (somente nos 18 dias iniciais)
F3	Lodo ativado + Cloranfenicol	0,96	0	↓	Batelada alimentada	Desnitrificação intensa
F4	Lodo ativado	0,15	0	↓	Batelada alimentada	Desnitrificação até 102 dias, depois sem atividade
F5	Lodo anaeróbio	0,50	0	↓	Batelada alimentada	Desnitrificação até 170 dias, depois sem atividade
F6	Lodo anaeróbio + cloranfenicol	1,30	↓	↓	Batelada alimentada	Desnitrificação e discreta remoção de amônia (de 158 até 207 dias, e de 270 até 334 dias)

↓= consumo; 0= nenhum consumo foi observado

O reator F6 apresentou além da atividade desnitrificante intensa, discreta remoção de amônia em dois períodos distintos, o que poderia sugerir início de atividade ANAMMOX. Não obstante, como este consumo está muito distante da estequiometria da reação ANAMMOX proposta por Strous *et al.* (1998) (que é de 1,32 mol de nitrito para cada 1 mol de amônia), não se pode afirmar com precisão se houve atividade ANAMMOX neste reator pois, se ocorreu, esta foi mascarada pelo processo de desnitrificação. Além disso, tal remoção de amônia não foi verificada novamente neste reator, nos dias subsequentes.

Atividade desnitrificante em reatores batelada usados para o enriquecimento de ANAMMOX, também foi verificado por Sanchez-Melsió *et al.* (2009). Esses autores testaram 12 inoculos diferentes para o enriquecimento de ANAMMOX. Verificaram que dos 12 experimentos realizados em frascos batelada, em 7 deles foi detectada e desenvolvida intensa atividade desnitrificante, sugerindo que em experimentos em batelada o desenvolvimento de atividade ANAMMOX dependerá em muito do inoculo utilizado. Em cinco desses enriquecimentos, usando lodo anóxico oriundo de RSB, sedimento de uma *wetland* artificial, e sedimento de uma lagoa salobra, conseguiram verificar atividade ANAMMOX. Em quatro destes experimentos a atividade ANAMMOX foi detectada após 12 meses de incubação, e, somente em um enriquecimento, a atividade foi detectada após 3 meses. Posteriormente, através de técnicas moleculares verificaram que *Brocadia anammoxidans* foi o organismo enriquecido, e detectado nesses reatores.

Comparando os resultados obtidos no presente estudo com os dados de Tsushima *et al.*, (2007b), no qual os autores incubaram 11 lodos (provenientes de diferentes plantas de tratamento de efluentes domésticos) em meio mineral autotrófico sob condições batelada (nas mesmas condições usadas no presente trabalho). Verificaram que dentre as 11 amostras testadas, em duas delas não conseguiram enriquecer bactérias ANAMMOX, mesmo tendo sido verificada (através da técnica de PCR quantitativo) a presença de $1,0 \times 10^7$ e $2,7 \times 10^7$ cópias do 16S rDNA de ANAMMOX por mg de lodo seco. Em 4 delas, conseguiram detectar atividade ANAMMOX, ou seja, o consumo simultâneo de amônia e nitrito foi verificado após 37, 54, 64 e 69 dias de incubação. Nessas amostras a concentração de ANAMMOX detectada foi de, respectivamente, $1,6 \times 10^8$, $2,4 \times 10^7$, $1,1 \times 10^8$ e $1,1 \times 10^7$ cópias do gene 16S RNAr de ANAMMOX por mg de lodo seco. Nas outras cinco amostras restantes detectaram atividade ANAMMOX, mas somente após 107, 143, 171 e 223 dias de incubação. Esses resultados evidenciam que mesmo que um lodo tenha apresentado resultado positivo para a presença de ANAMMOX não significa que estas estejam em atividade, ou que mesmo após incubação em condições favoráveis para esta população, a atividade ANAMMOX seja detectada.

Ainda de acordo com os resultados de THUSHIMA *et al.* (2007a), quanto maior a concentração de ANAMMOX no lodo (em torno de 10^7 a 10^8) maior a chance de se detectar atividade ANAMMOX e em tempos curtos de incubação. No trabalho de Toh *et al.* (2002), os autores incubaram amostras de lodos ativados em meio mineral autotrófico em condições batelada, na presença de diferentes inibidores (como cloranfenicol, cianeto, 2,2-dinitrofenol, e

dietilditiocarbamato). Conseguiram verificar atividade ANAMMOX (assim mesmo o consumo de amônia foi muito pequeno) somente para as amostras incubadas com cloranfenicol (porém após vários subcultivos). Para esses frascos (nos sub-cultivos) o consumo simultâneo de amônia e nitrito foi verificado somente quando as amostras foram incubadas em meio de cultura fresco com cloranfenicol e acrescido de 5% de CO₂ na atmosfera do frasco. Indicando que a presença de CO₂ estimulou o crescimento das bactérias ANAMMOX já que estas são autotróficas e podem utilizar o CO₂ como fonte de carbono. Não obstante, o enriquecimento das bactérias ANAMMOX só foi possível quando utilizaram reator contínuo de leito fixo (usando lodo ativado como inóculo e cloranfenicol). No reator, a atividade ANAMMOX começou a ser verificada após 5 meses de operação. Chamchoi e Nitorisavut (2007) conseguiram enriquecer bactérias ANAMMOX usando três reatores contínuos (operados como reator em batelada sequencial) inoculados cada um com um tipo diferente de lodo (proveniente de reator UASB, lodo ativado e lodo de digestor anaeróbio). A atividade ANAMMOX (representada pelo consumo simultâneo de amônia e nitrito) só foi verificada após 120 dias de operação dos reatores, indicando que o enriquecimento dessas bactérias é um processo extremamente lento. Egli *et al.*, (2001) conseguiram enriquecer bactérias ANAMMOX em frascos batelada através da técnica de diluição e enriquecimento. Verificaram imediatamente consumo de amônia e nitrito, quando inocularam 0,5 g de biofilme (proveniente de reator nitrificante que apresentava de 40 a 70% de remoção de nitrato em presença de pequenas concentrações de carbono orgânico), em 1 litro de meio mineral autotrófico contendo 6mM de nitrito e 5,2 mM de amônia. Portanto, a resposta rápida desse inóculo frente ao meio de cultura apropriado se deveu ao fato das bactérias ANAMMOX terem sido enriquecidas previamente no reator nitrificante.

Os lodos do reator UASB e lodo ativado usados no presente trabalho, apesar de apresentarem resultados positivos para a presença de ANAMMOX (de acordo com o trabalho prévio), não apresentavam atividade ANAMMOX dentro dos reatores, ou seja, o reator UASB não apresentou perda de amônia sob condições anaeróbias, tampouco o sistema de lodos ativados. Não obstante, é importante esclarecer que esse reator UASB foi operado durante muito tempo acoplado a um filtro biológico percolador (ou seja, o lodo do UASB era retornado para o filtro biológico para adensamento e digestão anaeróbia funcionando como possível fonte de nitrito ou nitrato), sendo que o efluente do filtro era recirculado para o reator UASB, portanto provavelmente havia entrada de nitrito neste reator oriundo do processo de nitrificação que ocorria no filtro.

Acredita-se que essa seja a explicação mais provável para a presença de ANAMMOX no lodo deste reator UASB tratando esgoto doméstico. Portanto, enriquecer bactérias ANAMMOX em condições batelada e batelada alimentada, partindo de lodos sem atividade ANAMMOX aparente, é muito mais difícil e demanda muito tempo (segundo os dados de Tsushima *et al.*, 2007b pode variar de 37 à 223 dias), ou até mesmo pode-se não chegar a detectar a atividade, de acordo com os dados obtidos no presente trabalho. Alguns trabalhos conseguiram enriquecer bactérias ANAMMOX a partir de lodos provenientes de reatores UASB e de sistema de lodos ativados, que não apresentavam atividade ANAMMOX prévia. Porém todos utilizaram reatores contínuos (reator em batelada sequencial) e o tempo para o início da detecção de atividade ANAMMOX variou de 50 dias (THIRD *et al.*, 2002), 70 dias (DAPENA-MORA *et al.*, 2004) até 120 dias (CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007), o que pode indicar que cada lodo responde de forma diferente às condições de cultivo, já que de modo geral os três artigos mencionados utilizaram meio de cultura e condições de temperatura, pH e anaerobiose semelhantes.

O lodo ativado usado como inóculo nos reatores F3 e F4 foi utilizado para inocular um fermentador de 1 litro, operado em condição batelada sequencial, com TDH de 24 horas. Nesse trabalho (ARAUJO⁷ *et al.*, (2009), verificou-se que após 90 dias de enriquecimento e cultivo, sob condições controladas de pH, temperatura, e anaerobiose, houve consumo simultâneo de amônia e nitrito, indicando início de atividade ANAMMOX. Tal remoção se aproximou da relação estequiométrica prevista na literatura. Portanto, o lodo ativado pode ser considerado um bom inóculo para o enriquecimento de bactérias ANAMMOX, mas o enriquecimento deve ser feito em sistema contínuo (RBS) e não em reatores batelada. Nesta última condição, o processo favorecido foi a desnitrificação e não o processo ANAMMOX, conforme dados apresentados nesta dissertação.

A eficiência de remoção de nitrogênio pela ANAMMOX em planta real instalada em Rotterdam, segundo dados do gerente de operação Wieb Abma⁸ em 2009, atingiu 95-99% de remoção de amônia. A Figura 5.10 ilustra o cenário obtido na planta instalada em Paques BV. O reator foi projetado para 500 Kg N/d, sendo que conforme dados de 2009, tem apresentado boa performance quando alimentado com 800 /d.

⁷ARAUJO, J.C.; CAMPOS, A. P.; CORREA, M.M.S.; CHERNICHARO, C.A.L.; VON SPERLING, M. Enriquecimento e cultivo de bactérias anammox a partir de lodos ativados. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2009, Recife-PE, Brasil, ABES, 2009. In press.

⁸ ABMA, W. (w.abma@paques.nl). Dados de eficiência de reator Anammox em Rotterdam. Mensagem recedida em 11 ag.2009.

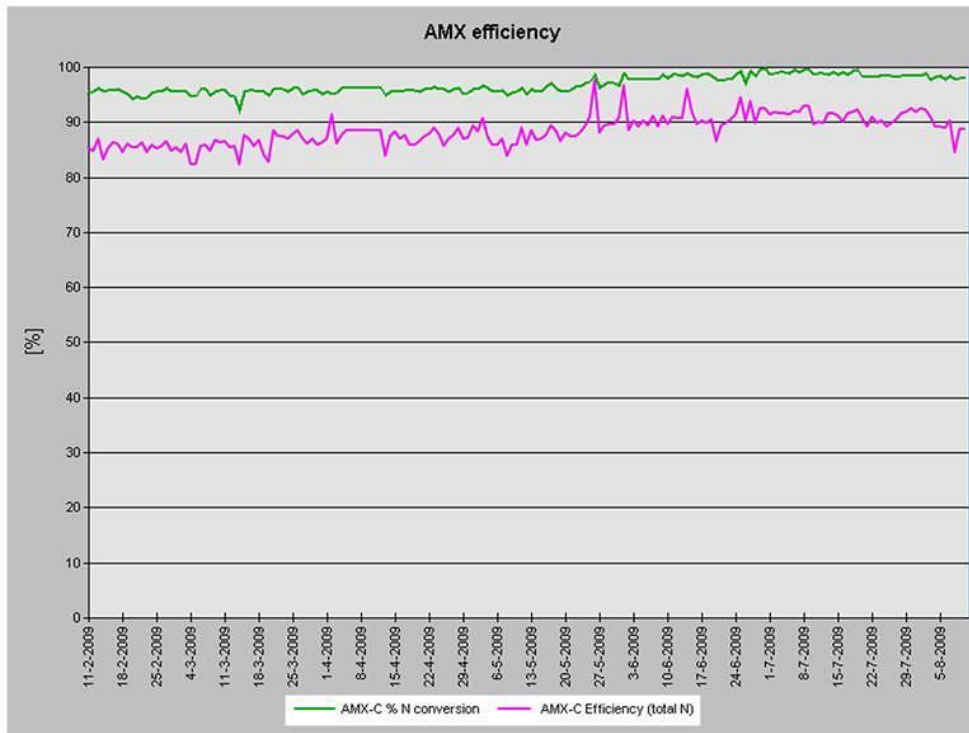


Figura 5.10 - Performace da planta com Anammox em Rotterdam em 2009.
 Dados fornecidos por: Abma, W. Technology Manager Paques bv

6 CONCLUSÃO

O isolamento e enriquecimento de biomassa ANAMMOX, a partir de uma comunidade bacteriana proveniente de lodo de sistema de lodos ativados e reator anaeróbio, requer a otimização das condições, a fim de favorecer o crescimento da biomassa ANAMMOX. Para tanto é necessário limitar o crescimento de outros tipos de microrganismos, principalmente as bactérias heterotróficas, que competem pelo mesmo substrato com as ANAMMOX (conforme verificado neste trabalho, devido ao elevado consumo de nitrito).

Neste trabalho não foi observada atividade ANAMMOX nos reatores inoculados com os lodos aeróbio e anaeróbio, mesmo após longo tempo de incubação que variou de 231 a 430 dias. A atividade desnitrificante verificada pode ter sido favorecida pela condição em batelada dos reatores, permitindo que as bactérias heterotróficas do lodo sobrevivessem durante todo o processo. Em resumo, não foi observado, nos seis reatores testados, consumo simultâneo de amônia e de nitrito, o que indicaria oxidação da amônia sob condições anaeróbias. Portanto, não foi possível enriquecer bactérias ANAMMOX nas condições usadas neste trabalho.

O cloranfenicol, adicionado aos reatores F3 e F6 para inibir o crescimento dos microrganismos competidores às ANAMMOX, principalmente as bactérias desnitrificantes, parece não ter impedido ou limitado o crescimento destes microrganismos uma vez que estes reatores, suplementados com o antibiótico, apresentaram oscilações nos resultados de nitrito, o qual chegou a ser consumido completamente em vários dias consecutivos durante o período de operação.

As análises de FISH realizadas nas amostras dos reatores, bem como nos lodos de inóculo, com a sonda específica para as ANAMMOX, apresentaram resultados negativos. Esses resultados indicam que as bactérias ANAMMOX não estavam presentes nessas amostras, ou poderiam estar, mas em concentração inferior ao limite de detecção da técnica.

7 RECOMENDAÇÕES

As recomendações sugeridas abaixo se referem basicamente aos procedimentos ao longo do monitoramento e da evolução de cada reator. Assim, recomenda-se uma adaptação na metodologia de acordo com a resposta de cada reator quanto ao crescimento microbiológico e dados físico-químicos.

- Ao longo do experimento, é recomendável que a manipulação dos reatores seja feita em capela anaeróbia, uma vez que trata-se de ambiente anaeróbio e a presença de residual de oxigênio inibe o crescimento das ANAMMOX.
- A necessidade de troca periódica das rolhas de butila, mesmo com concomitante fluxionamento de gás argônio, causou uma interferência negativa na eficiência dos reatores. Sendo assim, o processo de enriquecimento de ANAMMOX utilizando reatores em batelada sem um controle automatizado e hermético de troca de meio e alimentação com soluções, conforme operado neste experimento, pode não ser a técnica mais favorável para obtenção do sucesso neste enriquecimento. Há necessidade de mais pesquisas e experimentos com reator sequencial que garanta as condições anaeróbias.
- Em virtude da ocorrência de odor sugestivo de gás sulfídrico ao longo do experimento, especificamente nos reatores F3 e F6, é recomendável um teste paralelo com meio de cultura contendo cloreto de amônio em comparação ao sulfato de amônio.
- Em complemento ao proposto anteriormente, sugere-se ensaios microbiológicos e físico-químicos para elucidação da ocorrência e origem do gás sulfídrico presente através de uma pesquisa com *primers* específicos para bactérias oxidadoras de sulfato bem como a detecção e quantificação de H₂S nos reatores.
- Pelos gráficos de pH apresentados nas Figuras 5.8 A e 5.8 B referente aos reatores F1 e F2, observou-se que a oscilação na concentração de NH₄⁺ efluente não necessariamente está associada à variação pertinente de pH. No caso do gráfico que retrata o perfil de pH do reator F1, tal fato merece mais cuidado em relação à necessidade de análise de alcalinidade para melhor monitoramento da interferência da acidez no sistema. É recomendável o monitoramento deste parâmetro desde a amostra de lodo inoculada nos reatores.

- Na análise de FISH, recomenda-se a pesquisa e o uso de sondas fluorescentes específicas para bactérias desnitrificantes, o que permite uma identificação mais precisa da flora competidora presente no reator.
- Finalmente, como pontos importantes para o sucesso do enriquecimento (estratégias) de ANAMMOX por batelada, são imprescindíveis: a caracterização da amostra utilizada como inóculo, cuidado na concentração inicial dos substratos nitrito e amônia e garantia de anaerobiose no reator. A presença de flora competidora, especificamente de bactérias desnitrificantes nos reatores, certamente necessita ser inibida a partir da pesquisa e identificação das características desta flora.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELIOVICH, A. & VONSHAK A. Anaerobic metabolism of nitrosomonas europaea. *Archives of microbiology*, v. 158, p. 267-270, 1992.

AFKHAMI, A. & NOROOZ-ASL, R.. Micelle mediated extration and spectrophotometric determination of ammonia in water samples utilizing indophenol dye formation. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 8, p. 1546-1552, 2008.

AMANN, R.I.; BINDER, B.J.; OLSEN, R.J.; CHRISHOLM, S.W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, v. 56, p. 1919-1925, 1990a.

AMANN, R.I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D.A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal Bacteriology*, v. 172, p. 762-770, 1990b.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.. Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation. *Microbiol Rev.* vol. 59. p. 143-169, 1995.

AMANN, R.I.; FUCHS, B. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n.5, 2008.

APHA; AWWA; WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21^a. ed. Washington: APHA, 2005.

ARAUJO, J.C.; BRUCHA, G.; VAZOLLER, R.F.; CAMPOS, J.R. Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Water Science and Technology* , v. 41, n. 12, p. 69-77, 2000.

ARAUJO, J.C.; MORTARA, R.; VAZOLLER, R.F.; CAMPOS, J.R. Development and analysis of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Environmental Technology* , v. 25, p. 809-817, 2004.

ARAUJO, J.C.; CHERNICHARO, C.A.L. Detection of Anaerobic Ammonium-oxidizing bacteria in different sludges and in a landfill leachate sample. 11th World Congress on Anaerobic Digestion (AD11)", 2007, Austrália, Anais do Congresso, 2007.

ARAUJO⁷, J.C.; CAMPOS, A. P.; CORREA, M.M.S.; CHERNICHARO, C.A.L.; VON SPERLING, M.. *Enriquecimento e cultivo de bactérias anammox a partir de lodos ativados*. In: 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2009, Recife-PE, Brasil, ABES, 2009. In press.

BITTON, G.. *Wastewater Microbiology*. Wiley Liss Pub., New York, 449 p., 2005.

BOLLMANN, A. & LAANBROEK, H. J.. Continuous culture enrichments of ammonia-oxidizing bacteria at low ammonium concentrations. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 37, p. 211-221, 2001.

BOCK, E. & WAGNER, M.. Oxidations of inorganic nitrogen compounds as an energy source. *Prokaryotes*, v. 2, p. 457-495, 2006.

BOUCHARD, D. C.; WILLIAMS, M. K.; SURAMPALLI, R. Y.. Nitrate Contamination of Groundwater: Sources and Potential Health Effects. *Journal AWWA*, vol. 84 Issue 9, p. 85-90., 1992.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – Conselho Nacional do meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, mar. 2005d., 23 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – Conselho Nacional do meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 397, de 03 de abril de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, mar 2008d, 4 p.

BRODA E.. Two kinds of litotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.*, v. 17, p. 491-493, 1977.

CARMOUZE, J.P.. *O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas*. São Paulo: Edgar Blucher, Fapesp, 1994, 253p.

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

CHERNICHARO, C. A. L.. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – Reatores Anaeróbios*. 2ª Edição, Belo Horizonte, Minas Gerais: Editora UFMG, 2007. 379 p., vol. 5.

DAPENA-MORA, A.; VAN HULLE, S.W.H.; CAMPOS, J.L.; MENDEZ, R.; VAN ROLLEGHEM, P.A.; JETTEN, M.. Enrichment of Anammox biomasa from municipal activated sludge: experimental and modeling results. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v. 79 p. 1421-1428, 2004.

DEEB, B. S.; SLOAN, K. W.. Nitrates, Nitrites and Health . *Bulletim 750 Agricultural Experiment Station*: University of Illinois at Urbana, Champaign, 41 p., 1975.

EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H.R.; ZEHNDER, A. J. B.. Enrichment and characterization of an Anammox bacterium from a rotating biological contator treating ammonium-rich leachate. *Arch Microbiol.*, v.175, p. 198-207, 2001.

FUX, C.; BOEHLER, M.; HUBER, P.; BRUNNER, I.; SIEGRIST, H.. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. *Journal of Biotechnology*, v. 99, p. 295-306, 2002.

GÜVEN, D.; DAPENA, A.; KARTAL, B.; SCHMID, M.C.; MAAS, B.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; SOZEN, S.; MENDEZ, R.; OP DEN CAMP, H.J.M.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M.; SCHMIDT, I. Propionate oxidation by and Methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 1066-1071, 2005.

HELMER, C.; KUNST, S.; JURETSEHKO, S.; SCHIMID, M. C.; SCHLEIFER, K. H.; WAGNER, M.. Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. *Water Science and Technology*, v. 39, p. 13-21, 1999.

HELMER, C.; TROMM, C.; HIPPEN, A.; ROSENWINCKEL, K. H.; SEYFRIED, C. F.; KUNST, S.. Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm system. *Water Science Technology*, v. 43, p. 311-320, 2001.

HELLINGA⁵, C.; SCHELLEN, A.A.J.C., MULDER, J.W.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J.. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci. Technol.* v.37, p.135-142, 1998.

ISAKA, K.; DATE Y.; SUMINO T.; YOSHIE S.; TSUNEDA S.. Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtered reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 70, p. 47-52, 2006.

JETTEN, M.S.M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; ROBERTSON, L.; DE VRIES, S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G.. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Applied Water Management Research (STOWA)*, v. 71, p. 75-93, 1997.

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

JETTEN, M.S.M.; STROUS, M.; VAN de PAS-SCHOONEN, K.T.; VAN DONGEN, V.G.J.M.; VAN de GRAAF, A. A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G.. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Review*, v.22, p. 421-437, 1999.

JETTEN, M.S.M.; WAGNER, M.; FUERST, J.; LOOSDRECHT, M.V.; KUENEN, J.G.; STROUS, M.. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process. *Curr. Opin. Biotech.*, v. 12, n 3, p. 283-288, 2001.

JETTEN, M.S.M.; SCHMID M.; SCHMIDT, I.; WUBBEN, M.; VAN DONGEN, U.; ABMA, W.; SLIEKERS, O.; REVSBECH, N. P.; BEAUMONT, H. J. E.; OTTOSEN, E. V.; LANNBROEK, H. J.; CAMPOS-GOMEZ, J.L.; COLE, J.; VAN LOOSDRECHT, M.; MULDER, J. W.; FUERST, J.; RICHARDSON, D.; VAN DE PAS, K.; MENDEZ-PAMPIM, R.; THIRD, K.; CIRPUS, I.; VAN SPANNING, R.; BOLLMANN, A.; NIELSEN, L. P.; DEN CAMP, H. O.; SCHULTZ, C.; GUNDERSEN, J.; VANROLLEGHEM, P.; STROUS, M.; WAGNER, M.; KUENEN, J.G.. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, v. 1, p. 51-63, 2002.

JETTEN, M.S.M.; CIRPUST, I.; KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.A.; VAN DE PASSHOONEN, K. T.; SLIEKERS, O.; HAAIJER, S.; VAN DER STAR, W.; SCHMID, M.; VAN DE VOSSENBERG, J.; SCHMIDT, I.; HARHANGI, H.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G.; DEN CAMP, H. O.; STROUS, M.. 1994-2004: 10 Years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochemical Society Transactions*, v. 33, p. 119-123, 2005.

KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.A.; SLIEKERS, O.; SCHMID M. C.; SCHMIDT, I.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; VAN DE VOSSENBERG, J.; CIRPUS, I.; VAN DER STAR, W.; VAN LOOSDRECHT, M.; ABMA, W.; KUENEN, J. G.; MULDER, J. W.; JETTEN, M. S. M.; DEN CAMP, H. O.; STROUS, M.; VAN DE VOSSENBERG, J.. Application, ecophysiology and biodiversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, v. 3, p. 255-264, 2004.

KARTAL, B.; RATTRAY, J.; VAN NIFTRIK, L. A.; VAN DE VOSSENBERG, J.; SCHIMID R. I.; WEBB, S. S.; FUERST, J. A.; DAMSTÉ, J. S.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. Candidatus “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 30, p. 39-49, 2007.

KIELING, D. D.. “Estudo da remoção biológica a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas”. 2004. 106f. *Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)* – Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

KUNZ, A.; VANOTTI, M.; SZOGI, A.; GARCIA, M. C.; SCHIERHOLT, G.F.N.; SOARES, H. M.. Development of Anammox process for animal waste treatment: Experiences in Brazil. In INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AIR QUALITY AND WASTE MANAGEMENT FOR AGRICULTURE, 2007, Broomfield, Colorado, *Air and Waste Management Annual Conference Proceedings*, 4 p., 2007.

KUYPERS,⁴ M.M.M.; SLIEKERS, A.O.; LAVIK, G.; SCHIMID, M.; JORGENSEN, B.B.; KUENEN, J.G.; DAMSTÉ J.S.; STROUS, M. & JETTEN, M.S.M.. Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* v. 422, p. 608-611, 2003.

METCALF & EDDY. Wastewater Engineering: Treatment, disposal and reuse. McGraw Hill, 4° Ed.. N.Y., 1819p, 2003.

MONTENEGRO, M.A.P.; ARAUJO, J.C.; VAZOLLER, R.F.. Microbial community evaluation of anaerobic granular sludge from a hybrid reactor treating pentachlorophenol by using fluorescence in situ hybridization. *Water Science and Technology*, v. 48, n .6, p. 65-73, 2003.

MULDER, A.; VAN de GRAAF, A. A.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J. G.. Anaerobic ammonium discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, v 16, p. 177-184, 1995.

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

POLANCO, F.; POLANCO, M.; FERNANDEZ, N.; UREÑA, M. A.; GARCIA, P. A.; VILLAVARDE, S.. New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Research*, v.35, n. 4, p. 1111-1114, 2001.

PYNAERT, K.; SMETS, B. F.; WYFFELS, S.; BEHEYDT, D.; SICILIANO, S. D.; VERSTRAETE, W.. Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 3626-3635, 2003.

PRATES², K.V.M.C.. “Verificação da produção Biológica de Nitrogênio a partir de Lodos Anaeróbios Granulados Cultivados em Meio Contendo Nitrogênio Amoniacal e Baixas Concentrações de Compostos Orgânicos”. 1997. *Dissertação (Mestrado)*. Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.

QUAN, Z. X.; RHEE, S. K.; ZUO, J. E.; YANG, Y.; BAE, J. W.; PARK, S. T. L.; PARK, Y. H.. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environmental Microbiology*, v. 10, n. 11, p. 3130-3139, 2008.

RANDALL¹ C. W., BERNARD J.L. & STENSEL H.D.. Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal. *Technomic Publ. AG*, Brasil, Switzerland, 416p., 1992.

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

RODIER, J. *Análisis de las aguas*, Editora Omega, Barcelona, 1981, 1057 p.

SANCHÉZ, A. M.; CÁLIZ, J.; BALAGUER, M. D.; COLPRIM, J.; VILA, X.. Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems. *Chemosphere*, v. 75, p. 169-179, 2009.

SCHIERHOLT NETO, G. F.. “Desenvolvimento de uma flora de microorganismos oxidadores anaeróbios de amônia utilizando inoculos provenientes de dejetos suínos.” 2007. 116f. *Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)* – Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SCHMID, M.; TWACHTMANN U.; KLEIN M.; STROUS M.; JURETSCHKO S.; JETTEN M.S.M.; METZGER J.; SCHLEIFER K.H.; WAGNER M.. Molecular Evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 23, p. 93-106, 2000.

SCHMID, M.; WALSH, K.; WEBB, R.; RIJPSMA, W. I. C.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; VERBRUGGEN, M. J.; HILL, T.; MOFFETT, B.; FUERST, J.; SCHOUTEN, S.; DAMSTÉ, J. S. S.; HARRIS, J.; SHAW, P.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M.. *Candidatus* “*Scalindua brodae*,” sp. nov., *Candidatus* “*Scalindua wagneri*,” sp. nov.: two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 26, p. 529-538, 2003.

SCHMID, M. C.; MAAS B.; DAPENA, A.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.; VAN DE VOSSENBERG, J.; KARTAL, B.; VAN NIFTRIK, L.; SCHMIDT, I.; CIRPUS, I.; KUENEN, J. G.; WAGNER, M.; DAMSTÉ, J. S. S.; KYUPERS, M.; REVSBECH, N. P.; MENDÉZ, R.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M.. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 1677-1684, 2005.

SCHMIDT, I. & BOCK, E.. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Archives of Microbiology*, v. 167, n. 2-3, 1997.

SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; CIRPU, I.; STROUS, M.; BOCK, E.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M.. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria – Competitors or natural partners? *FEMS Microbiology Ecology*, v. 39, p. 175-181, 2002.

SCHIMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHIMID, M.; BOCK, E.; FUERST, J.A.; STROUS, M.; KUENEN, J.G.; JETTEN M.S.M.. New concepts of microbial treatments processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Review*, v.2, p. 481-492, 2003.

SEITZINGER, S.P.; STYLES, V. R.; BOYER, E. W.; ALEXANDER, B. R.; BILLEN, G.; HOWARTH, B. W.; MAYER, B.; VAN BREEMEN, N.. Nitrogen retention in rivers: model development and application to watersheds in the northeastern U.S.A. *Biogeochemistry*, v. 57-58, n. 1, p. 199-237, 2002.

SIEGRIST, H.; SALZGEBER, D.; EUGSTER, J.; JOSS, A.. Anammox brings WWTP closer to energy autarky due to increased biogas production and reduced aeration energy for N-removal. 11th World Congress on Anaerobic Digestion (AD11)", 2007, Austrália, Anais do Congresso, 2007.

SOUSA, J. T.; CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23º, Campo Grande. Avaliação do desempenho do reator UASB na desnitrificação de águas residuárias domésticas. Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 6p, 2005.

SOUSA³, J. T. & FORESTI, E.. Utilização de lodo anaeróbio como fonte externa de carbono no processo de desnitrificação de águas residuárias. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 69-73, 1999.

STROUS, M.; VAN GERVEN, E.; KUENEN, J.G.; JETTEN M.S.M.. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, issue 6, p. 2446-2448, 1997.

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

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

STROUS, M.; JETTEN, M.S.M.. Anaerobic oxidation of ammonium and methane. *Ann. Rev. Microbiol.* v. 53, 99-117, 2004.

TOH, S.K.; ASHBOLT, N.J.. Adaptation of anaerobic ammonium oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 59, 344 -352, 2002.

TAL Y.; WATTS J.E.M.; SCHREIER S.B.; SOWERS K. R.; SCHREIER, H. J.. Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. *Aquaculture*, v. 215, p. 187-202, 2003.

TAL, Y.; WATTS, J. E. M.; SCHREIER, H. J.. Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner Harbor sediment. *Applied Environmental Microbiology*, v. 71, n. 4, p. 1816-1821, 2005.

THIRD, K. A.; SLIEKERS, O.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.. The CANON System (Completely Autotrophic Nitrogen- removal Over Nitrite) under ammonium limitation:

interaction and competition between three groups of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 24, p. 588-596, 2002

THIRD, K. A.; PAXMAN, J.; SCHMID, M.; STROUS, M.; JETTEN, M.S.M.; CORD-RUWISH, R.. Enrichment of ANAMMOX from activated sludge and its application in the CANON process. *Microbial Ecology*, v. 49, p. 236-244, 2005.

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

TRIGO, J. L.; CAMPOS, J. M.; GARRIDO, R. M.. Star-up of the anammox process in a membrane bioreactor. *Journal of Biotechnology*, v. 126, p. 475-487, 2006.

TSUSHIMA, I.; KINDAICHI, T.; OKABE, S.. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research*, v.41, 785-794, 2007a.

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

TUNDISI, J. G.; Ciclo Hidrológico e gerenciamento integrado. *Gestão das águas*, p. 31-33, 2003.

TUNDISI, J. G.; Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. *Estudos Avançados*, v. 22, n. 63, p. 1-8, 2008.

VAN DE GRAAF, A.A.; de BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN, M.S.M., KUENEN, J.G.. Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidation micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v., p. 142: 2187-2196, 1996.

VAN DE GRAAF, A.A.; de BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN, M.S.M.; KUENEN, J.G.. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, v. 143, p. 2415-2421, 1997.

VAN DER MEER, J.R.; ZEEP, K.; EGGEN, R.. Modern methods for detection of microorganisms and their activity. *Bio World (Umwelt-Biotechnologie)* v. 5, p. 3-8, 1998.

VAN DONGEN, U.; VAN LOOSDRECHT, M.; JETTEN, M.. The SHARON-Anammox process for treatment of ammonia rich wastewater. *Wat. Sci. and Technol.*, v. 44, p. 153-160, 2001.

VAN NIFTRIK, L.A.; FUERST, J.A.; DAMSTE, J.S.S.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M.. The anammoxosome an intracytoplasmic compartment in Anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 233, p. 7-13, 2004.

VAN DER STAR, W. R. L.; ABMA, W. R.; BLOMERS, D.; MULDER, J. W.; TOKUTOMI, T.; STROUS, M.; PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.. Start up of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research*, v. 41, p. 4149-4163, 2007.

VANOTTI, M. B.; FURUKAWA, K.; GARCIA-GONZALEZ, M. C.; SZOGI, A. A.. Nitrogen Removal With The Anaerobic Ammonia Oxidation (Anammox) Process Using Polymer Gel Biomass Carrier Seeded With Swine Effluent Sludge. *Proceedings Of The American Society Of Agricultural Engineers*, Annual International Meeting, July 17-20, 2005, Tampa, Florida. 2005 Cdrom, 2005a.

VANOTTI, M.B.; SZOGI, A.A.; HUNT, P.G.; ELLISON, A.Q.; MILLNER, P.D.; HUMENIK, F.J.. Development Of An Environmentally Superior Treatment System For Replacing Anaerobic Swine Waste Lagoons. *In: Water Environment Federation Technical Exhibition And Conference (Weftec)*, October 29 - November 2, 2005, Washington, Dc. P. 4073-4092. Cdrom, 2005b.

VON SPERLING, M.. *Princípio do tratamento biológico de águas residuárias – Lodos Ativados*. Belo Horizonte, Minas Gerais: Editora UFMG, 2ª Edição, 2002. Vol. 4.

WAKI, M.; TOKUTOMI, T.; YOKOYAMA, H.; TANAKA, Y.. Nitrogen removal from animal waste treatment water by anammox enrichment. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2775-2780, 2007.

YE, R. W.; THOMAS, S. M.. Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, p. 307-312, 2001

ZUMFT, W. G.; The denitrifying prokaryotes. *In: Balows A Truper H, Dworkin M, Harder W & Schleifer K, ed. The Prokaryotes*, New York: Springer-Verlag, p. 554-582, 1992.

ZUMFT, W. G.; The biological role of nitrite oxide in bacteria. *Arch Microbiol*, v. 160, p. 253-264, 1993.

ANEXO I

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Solução H₂SO₄ 1 N

Em um béquer de 250 mL, contendo 195 mL de água deionizada estéril, adicionou-se lentamente 5,23 mL de H₂SO₄ concentrado, em constante agitação, sob assepsia em capela de fluxo laminar, com auxílio de micropipeta calibrada com capacidade de 10 a 1000 µL, 1000 a 5000 µL e proveta graduada esterilizada de 250 mL. A solução foi armazenada em frasco de vidro esterilizado, devidamente rotulado e armazenada a temperatura ambiente em local seco.

Solução CaCl₂.2H₂O 0,5 M

Em um béquer de 100 mL, pesou-se 14,7 g de CaCl₂.2H₂O, utilizando-se balança analítica (marca Scientech com precisão de 0,0001g). Adicionou-se cerca de 150 mL de água deionizada, com auxílio de proveta graduada. Utilizando-se um bastão de vidro, foi feita agitação da solução até completa dissolução. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume com água deionizada. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar. Antes do fechamento do frasco, foi fluxionado argônio puro 100% no interior da solução, com auxílio de pipeta graduada esterilizada, por aproximadamente vinte minutos, sendo cinco minutos na atmosfera do frasco. Após o fechamento do frasco com tampa de borracha e lacre de alumínio, a solução foi esterilizada em autoclave vertical por vapor úmido a 121° C por trinta minutos. A solução foi devidamente rotulada e armazenada sob refrigeração.

Solução MgSO₄.7H₂O 0,5 M

Em um béquer de 100 mL, pesou-se 24,6 g de MgSO₄.7H₂O, utilizando-se balança analítica. Adicionou-se cerca de 150 mL de água deionizada com auxílio de proveta graduada. Utilizando-se um bastão de vidro, foi feita agitação da solução até completa dissolução. Transferiu-se a solução para um balão de vidro de 200 mL e completou-se o volume com água deionizada. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar. Antes do fechamento do frasco, foi fluxionado argônio puro 100% no interior da solução, com auxílio de pipeta graduada esterilizada, por aproximadamente vinte minutos, sendo cinco minutos no *headspace* do frasco. Após o fechamento do frasco com tampa de borracha e lacre de alumínio, a solução foi esterilizada em autoclave vertical, por vapor úmido a 121° C por trinta minutos. A solução foi devidamente rotulada e armazenada sob refrigeração.

Solução de micronutrientes I

Em dois béqueres de vidro de 50 mL, pesou-se respectivamente 1,000g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,500g de FeSO_4 , utilizando-se balança analítica. Fez-se a dissolução com cerca de 50 ml de água deionizada em cada béquer e a transferência quantitativa para um balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de funil de vidro. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar e antes do fechamento do frasco, foi fluxionado argônio puro 100% no interior da solução, com auxílio de pipeta graduada, por aproximadamente vinte minutos, sendo cinco minutos no *headspace* do frasco. Após o fechamento do frasco com tampa de borracha e lacre de alumínio, a solução foi esterilizada em autoclave vertical por vapor úmido a 120° C durante trinta minutos. A solução foi devidamente rotulada e armazenada sob refrigeração.

Solução de micronutrientes II

Em béqueres de vidro de 50 mL, pesou-se respectivamente 1,500g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,043g de $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,024g CoCl_2 , 0,099g $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,025g $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,022 g $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,019g $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,008g Na_2SeO_3 e 0,0014g H_3BO_4 , utilizando-se balança analítica. Fez-se a dissolução com cerca de 10 ml de água deionizada em cada béquer e a transferência quantitativa para um balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de funil de vidro. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar e antes do fechamento do frasco, foi fluxionado argônio puro 100% no interior da solução, com auxílio de pipeta graduada, por aproximadamente vinte minutos, sendo cinco minutos na atmosfera do frasco. Após o fechamento do frasco com tampa de borracha e lacre de alumínio, a solução foi esterilizada em autoclave vertical por vapor úmido a 120° C durante trinta minutos. A solução foi devidamente rotulada e armazenada em temperatura ambiente.

Solução de cloranfenicol

Foram preparadas soluções de cloranfenicol em concentrações e solventes diferentes de acordo com o tipo de cloranfenicol comprado (se solúvel em água ou em álcool). Assim, inicialmente, utilizou-se uma solução de cloranfenicol (em água) na concentração de 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e posteriormente, uma solução de cloranfenicol alcoólica (100,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), conforme preparo descrito abaixo. Durante um período curto de tempo e devido a falta do reagente para preparo da solução 50,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi preparada uma solução aquosa 100,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, também descrita abaixo. Tão logo adquiriu-se novo reagente, esta solução não foi mais utilizada.

- Solução cloranfenicol aquosa 5,0% (50,0 mg.mL⁻¹)

Foi feita a reconstituição de 100,0 mg de cloranfenicol (marca Sigma) em 2,0 mL de água deionizada esterilizada, em capela de fluxo laminar, garantindo a completa dissolução da solução por agitação. A solução foi armazenada sob refrigeração por trinta dias, conforme recomendação do fabricante. Nos frascos reatores F4 e F9, periodicamente, foram adicionados de 0,3 mL a 0,5 mL desta solução. Portanto, a concentração final de cloranfenicol (adicionado) no frasco reator variava de 0,015 a 0,025 mg.mL⁻¹.

- Solução cloranfenicol alcoólica 10% (100,0 mg.mL⁻¹)

Em ambiente asséptico e com uso de vidraria e utensílios esterilizados, pesou-se 1,00g de cloranfenicol (marca Sigma) e dissolveu-se em 10,0 mL de álcool absoluto 98%. Após completa dissolução da solução o frasco foi tampado com rolha de borracha e armazenado sob refrigeração, e em ausência de luz, por trinta dias, conforme recomendações do fabricante. Nos frascos reatores F4 e F9, periodicamente, foram adicionados de 1,0 mL a 2,0 mL desta solução. Portanto, a concentração final de cloranfenicol (adicionada) no frasco reator variava de 0,1 a 0,2 mg.mL⁻¹.

- Solução cloranfenicol aquosa 100,0 mg.mL⁻¹

Em ambiente asséptico e com uso de vidraria e utensílios esterilizados, 1,00g de cloranfenicol (marca Sigma) foi dissolvido em 10,0 mL de água deionizada estéril. Após completa dissolução da solução, o frasco foi fechado com tampa de borracha e armazenado sob refrigeração por trinta dias, conforme recomendações do fabricante. Nos frascos reatores F4 e F9, periodicamente, foram adicionados de 1,0 mL a 2,0 mL desta solução. Portanto, a concentração final de cloranfenicol adicionado no frasco reator variava de 0,1 a 0,2 mg.mL⁻¹.

Solução estoque de nitrito de sódio 600 mM

Em béquer de 100 mL pesou-se 8,28g de NaNO₂, utilizando-se balança analítica marca *Scientech* com precisão de 0,0001g. Após completa dissolução com cerca de 150 mL de água deionizada, foi feito o ajuste do volume final da solução para 200 mL em balão volumétrico. Em frasco âmbar de boca estreita, foi fluxionado argônio 100% por aproximadamente vinte minutos no interior da solução, com auxílio de pipeta graduada esterilizada. Após fechamento do frasco com rolha de borracha e lacre de alumínio, a solução foi esterilizada em autoclave vertical por trinta minutos a 121°C. Armazenou-se a solução sob refrigeração.

Solução estoque de sulfato de amônia 600 mM

Em béquer de 100 mL pesou-se 15,86g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utilizando-se balança analítica marca Scientech com precisão de 0,0001g. Após completa dissolução com cerca de 150 mL de água deionizada, foi feito o ajuste do volume final da solução para 200 mL em balão volumétrico. Em frasco âmbar de boca estreita, foi fluxionado argônio 100% por aproximadamente vinte minutos no interior da solução, com auxílio de pipeta graduada esterilizada. Após fechamento do frasco com rolha de borracha e lacre de alumínio, a solução foi esterilizada em autoclave vertical por trinta minutos a 121°C. Armazenou-se a solução sob refrigeração.

Solução de nitrato de sódio 600 mM

Em béquer de 100 mL pesou-se 5,01g de NaNO_3 , utilizando-se balança analítica marca Scientech com precisão de 0,0001g. Após completa dissolução com cerca de 150 mL de água deionizada, foi feito o ajuste do volume final da solução para 200 mL em balão volumétrico. Em frasco âmbar de boca estreita, foi fluxionado argônio 100% por aproximadamente vinte minutos no interior da solução, com auxílio de pipeta graduada esterilizada. Após fechamento do frasco com rolha de borracha e lacre de alumínio, a solução foi esterilizada em autoclave vertical por trinta minutos a 121°C. Armazenou-se a solução sob refrigeração.

Solução de hidrazina 100mM

Com uso de micropipetas, adicionou-se 1,215 mL de hidrazina (marca Aldrich) em béquer de 200 mL e promoveu-se a dissolução com cerca de 100 mL de água deionizada esterilizada. Fez-se a transferência quantitativa para balão volumétrico de 250 mL e completou o volume com água deionizada esterilizada. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar, fechada com tampa de borracha e lacre de alumínio e autoclavada em autoclave a 121 °C por trinta minutos. A solução foi devidamente rotulada e armazenada em temperatura ambiente.

Solução de hidroxilamina 100 mM

Mediu-se 1,11 mL de hidroxilamina (marca Aldrich) e diluiu-se em 150 mL de água deionizada esterilizada. Fez-se a transferência quantitativa para balão volumétrico de 200 mL e completou o volume com água deionizada esterilizada. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar, fechada com tampa de borracha e lacre de alumínio e autoclavada em autoclave vertical a 121 °C por trinta minutos. A solução foi devidamente rotulada e armazenada em temperatura ambiente.

Solução de sulfito de sódio 10 mM

Pesou-se 0,252 g de Na_2SO_3 , utilizando-se balança analítica (marca Scientech) com precisão de 0,0001g. Após diluição com água ultrapura, completou-se o volume em balão volumétrico para 200 mL. Transferiu-se para frasco âmbar e fluxionou-se argônio 100% por aproximadamente vinte minutos com pipeta estéril invertida, acoplada na mangueira do gás. Após fechamento do frasco com rolha de borracha e lacre de alumínio, a solução foi esterilizada em autoclave vertical por trinta minutos a 121°C. Armazenou-se a solução em temperatura ambiente.

Solução fenol 10%

Em capela de exaustão, dissolveu-se 10,00 g de fenol p.a. (marca JTBacker) em cerca de 80 mL de álcool etílico 95%. Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume. A solução foi armazenada em frasco âmbar com tampa de rosca esmerilhada sob refrigeração, sendo estável por um mês.

Solução de nitroprussiato de sódio 0,5%

Dissolveu-se 0,50 g de nitroprussiato de sódio p.a. (marca Vetec) em cerca de 80 mL de água ultrapura. Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume. A solução foi armazenada em vidro âmbar sob refrigeração, sendo estável por um mês.

Solução alcalina

Dissolveu-se em béquer de 200 mL 50 g de citrato de sódio (marca Synth) e 2,5 g de hidróxido de sódio p.a. (marca FMaia) em cerca de 125 mL de água ultra pura. Após completa dissolução, promoveu-se a transferência para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume. A solução foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração.

Solução padrão de amônia

Dissolveu-se 3,82 g de cloreto de amônio (marca Merck) e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água ultrapura. Cada mL desta solução contém 1,29 mg de NH_4^+ .

Solução estoque de amônia μM

A partir da solução padrão de amônia, pipetou-se um volume de 140 μL para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água ultrapura.

Reagente de cor para análise de nitrito

Em cerca de 80 mL de água ultrapura, adicionou-se 10,0 mL de ácido fosfórico 85% (marca Merck) e 1 g de sulfanilamida (marca Merck). Após completa dissolução da solução, acrescentou-se 0,1 g de cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (marca Sigma-Aldrich), promovendo completa mistura da solução. Esta mistura foi então transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água ultrapura. A solução foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração, sendo estável por um mês ou enquanto não houver alteração de cor (incolor para rosa-avermelhado).

Solução estoque de nitrito

Dissolveu-se 1,2527 g de nitrito de sódio (marca Merck) com água ultra pura e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água ultra pura. Cada mL desta solução contém 0,250 mg de N.

Solução intermediária de nitrito

Pipetou-se 51,9 mL de solução estoque de nitrito recém preparada em balcão volumétrico de 250 mL, completando o volume com água ultrapura.

Solução padrão de nitrito

Pipetou-se 10,0 mL da solução intermediária de nitrito em balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água ultrapura.

Solução de salicilato sódico 5%

Pesou-se 0,25 g de salicilato de sódio (marca Merck) em béquer e fez-se a diluição com água ultrapura. Após dissolução completa do sal, a solução foi transferida para balão volumétrico de 5,0 mL, completando-se o volume com água ultrapura. Esta solução foi sempre preparada no dia de uso, pois tem validade de vinte e quatro horas.

Solução de tartarato de sódio e potássio

Em um béquer plástico de 1000 mL foi dissolvido 400,0 g de hidróxido de sódio p.a. (marca FMaia) em cerca de 800 mL de água ultrapura. A esta solução foi adicionado 60,0 g de tartarato de sódio e potássio (marca Merck), promovendo constante agitação do líquido. Após completa dissolução e resfriamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume final completado com água ultrapura. A solução foi armazenada em frasco de polietileno.

Solução estoque de nitrato

Dissolveu-se 0,722 g de nitrato de potássio (marca Merck) com água ultrapura e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água ultra pura. Cada mL desta solução contém 0,1 mg de nitrogênio nítrico.

Solução padrão de nitrato 0,005 g.L⁻¹

Pipetou-se 50,0 mL da solução estoque de nitrato em balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água ultrapura.