

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

ENRIQUECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS ANAMMOX PARA A REMOÇÃO DE
NITROGÊNIO AMONÍACAL DE EFLUENTES

Ana Paula Campos

Belo Horizonte

2011

**ENRIQUECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS ANAMMOX PARA A REMOÇÃO DE
NITROGÊNIO AMOCIACAL DE EFLUENTES**

Ana Paula Campos

Ana Paula Campos

**ENRIQUECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS ANAMMOX PARA A REMOÇÃO DE
NITROGÊNIO AMONÍACAL DE EFLUENTES**

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

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de águas residuárias

Orientador: Juliana Calábria de Araújo

Co-Orientador: Carlos Augusto de Lemos Chernicharo

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2011

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

DEDICATÓRIA

A DEUS e ao meu Anjo da Guarda.

Aos meus pais (à minha mãe pela total paciência e dedicação).

À vovó Maria e ao vovô Elpídio, pelo exemplo de vida com o qual me presentaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos amigos espirituais por ter conseguido alcançar mais este objetivo.

A minha mãe, por propiciar as condições para eu estudar, pelo apoio incondicional, pelo carinho e amor, pela constante preocupação e orações, pelos almoços e “lanchinhos”, por entender minha ausência e simplesmente por fazer parte da minha vida. Ao meu pai, pelo apoio, por respeitar minhas decisões e por todo o auxílio e torcida.

A minha orientadora, prof^a. Juliana Calábria de Araújo, pela orientação neste trabalho, pela confiança que depositou em mim, pela educação, paciência, respeito, incentivo, por sempre respeitar minhas opiniões e pela inteligência e simplicidade em me ajudar em todos os momentos os quais eu a solicitei, desde as questões mais simples às mais complexas.

Ao meu co-orientador, prof. Carlos Chernicharo, pelo incentivo a realização do trabalho, pelos pareceres pertinentes e pela confiança depositada.

Aos meus familiares por compreenderem minha ausência e por torcerem pelo sucesso dessa empreitada. Em especial aos meus irmãos Flávio e Letícia, meus cunhados Isabela e Jaime e meus afilhados Paula, Ana Luíza e Marcelinho.

A Maria Claret de Souza Carvalho e Eduardo de Castro por me apresentarem o DESA.

A Renata Cortês pelo interesse e empenho em me auxiliar no cultivo das bactérias anammox e nas demais tarefas do laboratório.

Ao Marcos Messias, Eduardo Carvalho e Douglas Boniek pela parceria no trabalho, pelo empenho com que me auxiliaram nas análises de Biologia Molecular e pela convivência no laboratório.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, imprescindível para eu me dedicar exclusivamente ao mestrado, e a FAPEMIG e FINEP que financiaram a pesquisa.

Ao apoio da COPASA em fornecer o lodo ativado proveniente da ETE Arrudas, e ao Sr. Raimundo, colaborador do CePTS – DESA/UFMG.

Aos meus companheiros do laboratório de Microbiologia pela ajuda que me dispensaram no aprendizado da biologia molecular e pela convivência familiar: Adriana, Cristina, Douglas, Edu, Érika, Fernanda, Fran, Grazi, Lud, Marcos, Mônica, Renata e Val.

Aos colegas do programa de pós-graduação que colaboraram comigo em algum momento, principalmente, André Baxter, André Cordeiro, André Rosa, Livia Lobato, José Rubenildo e Olívia Vasconcelos.

A prof^a. Maria Helena Matté, da faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade e atenção em realizar a clonagem, o sequenciamento e a análise filogenética das amostras do RBS.

Ao Sport Clube Internacional pelas alegrias e pelos grandes amigos que me proporcionou.

Aos Beatles (“*All you need is Love...*”), Led Zeppelin, Pink Floyd, Rolling Stones, Vinícius de Moraes e Chico Buarque por, muitas vezes, aliviarem meu cansaço e desânimo.

Aos funcionários do DESA, pela colaboração em diversas atividades acadêmicas, laboratoriais e burocráticas particularmente a Iara, a Cláudia, Olívia e Lucilaine.

Aos colegas do DESA pela agradável companhia durante os nossos almoços: Suzane, Cris, Sielen, Vinícius, Gabriel e Camila.

Aos amigos que estiveram presentes, me incentivando e torcendo por mim, tanto nos meus momentos pessoais quanto no trabalho, vocês são muito especiais: Flavimar, Mariana, Gabi, Malú, Maria, Iêda, Tetê, Clarinha, Natty, Dani, Felipe Carvalho, Rafael Buono, Cibele, Marinight, Bárbara, Karine, Angélica, Greace, Márgara, Fábio, Gonça, Milano e Renan.

A grande família “Campos”, tios, tias, primos, primas, e a presença da vovó Maria e do vovô Elpídio (*in memoriam* eu sei que eles estavam presentes).

A D^a Chica pelo otimismo, a equipe da limpeza e aos porteiros por fazerem a Escola de Engenharia um lugar agradável de conviver.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e/ou da minha vida, nestes dois anos ou que simplesmente se interessaram em saber “e o mestrado?”

*“Nunca te é concedido um desejo sem que te seja
concedida também a facilidade de torná-lo realidade.
Entretanto, é possível que tenhas que lutar por ele.”*

Richard Bach

RESUMO

A remoção de nitrogênio é fundamental no tratamento de águas residuárias e geralmente é realizada por processos microbiológicos como nitrificação e desnitrificação. A oxidação anaeróbia do íon amônio (ANAMMOX- **A**naerobic **A**mmonium **O**xidation) com nitrito levando a N_2 é uma reação mediada por microrganismos (bactérias anammox), descoberta há mais dez anos em um biorreator desnitrificante, e que apresenta potencial para remoção de nitrogênio de águas residuárias. O objetivo deste trabalho foi o de enriquecer e produzir biomassa anammox, usando como inóculo lodo aeróbio proveniente do sistema de lodos ativados da ETE Arrudas – COPASA. O enriquecimento e cultivo foram feitos em Reator em Batelada Sequencial (RBS) de 1,2 L, alimentado com meio mineral autotrófico sob condições anaeróbias, temperatura de 34°C, e tempo de detenção hidráulica de 24 horas. Este procedimento foi realizado em dois experimentos distintos. No experimento I, atividade Anammox foi detectada após 90 dias de cultivo, pelo consumo simultâneo de quantidades estequiométricas de NO_2^- e NH_4^+ no sistema. Análises de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) revelaram que as bactérias anammox representaram 53% do total de células após 6 meses de enriquecimento, e que bactérias nitrificantes não estavam presentes no reator. A eficiência média de remoção de amônia e nitrito foi de 90%. A identificação filogenética realizada através de clonagem, sequenciamento e análise comparativa do DNAr 16S, revelou que a maioria dos clones estava proximoamente relacionada com *Candidatus Brocadia sinica*. E um clone apresentou sequência relacionada com *Candidatus Brocadia sp.* 40 (98% de identidade), e pode representar uma espécie nova para a qual sugere o nome de *Candidatus Brocadia brasiliensis*. No experimento II, foi utilizado volume maior de inóculo, e a atividade anammox foi detectada após 50 dias de cultivo. Análises de FISH demonstraram que a biomassa enriquecida era composta por anammox (provavelmente *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia*), *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, indicando coexistência e competição dessas populações. Os resultados do FISH também revelaram que a população de anammox compreendeu cerca de 23 a 48% do total de células deste enriquecimento. A eficiência média de remoção de amônia e nitrito obtida neste experimento foi de 60 %. Conclui-se, portanto, que o enriquecimento das anammox foi possível a partir de amostra de lodo ativado, sob condições controladas em RBS, em período de 2 a 3 meses. Os resultados da comparação dos dois experimentos sugeriram que o volume de inóculo e a composição do meio afluente (concentração dos compostos nitrogenados) provavelmente desenvolveram papel importante na seleção da comunidade microbiana desenvolvida no RBS em cada um dos experimentos.

ABSTRACT

Nitrogen removal is essential in the treatment of wastewater and is typically performed by microbiological processes such as nitrification and denitrification. The anoxic ammonium oxidation (ANAMMOX) with nitrite leading to N_2 is a reaction mediated by microorganisms (anammox bacteria), discovered for more than ten years ago in a denitrifying bioreactor, which presents the potential for nitrogen removal from wastewater. The aim of this study was to enrich and produce anammox biomass using as inoculum sludge from the municipal WWTP Arrudas - COPASA activated sludge system, which treats domestic sewage from the city of Belo Horizonte. The enrichment and cultivation were done in a Sequencing Batch Reactor (SBR) of 1.2 L, fed with autotrophic mineral medium under anaerobic conditions, temperature of 34°C, and hydraulic retention time of 24 hours. This procedure was performed in two different experiments. In experiment I, anammox activity started to be detected after 90 days of cultivation, by the simultaneous consumption of stoichiometric amounts of NO_2^- e NH_4^+ in the system. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis revealed that anammox bacteria accounted for 53% of total bacteria after 6 months of enrichment, and that nitrifying bacteria were not present in the reactor. The average ammonia and nitrite removal efficiency was 90%. The phylogenetic identification performed by cloning, sequencing and comparative analysis of 16S rDNA revealed that most of clones were closely related to *Candidatus Brocadia sinica* (with sequence similarity of more than 99%). However, one clone was related to *Candidatus Brocadia sp.* 40 (with 98% of identity), and might represent a novel species for which we propose the name *Candidatus Brocadia brasiliensis*. In experiment II, a larger volume of inoculum was used and anammox activity was detected after 50 days of cultivation. FISH analysis showed that the biomass developed in the SBR was composed by anammox cells (likely *Ca. Brocadia* and *Ca. Kuenenia*), *Nitrosomonas* and *Nitrospira*, suggesting that coexistence and competition between these populations occurred. FISH results also revealed that anammox bacteria accounted for 23 to 45% of total bacteria in this enrichment. The average ammonia and nitrite removal efficiency was 60%. Thus, it can be concluded that anammox enrichment was possible from activated sludge under controlled conditions within two to three months. The comparison results of both experiments suggested that the volume of inoculum and the composition of the feed (nitrogen compounds concentrations) probably played an important role in the selection of the microbial community developed in the RBS for each of the experiments.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1 O CICLO BIOGEOQUÍMICO DO NITROGÊNIO E SUAS FORMAS PRESENTES NO AMBIENTE.....	6
3.2 BACTÉRIAS ANAMMOX E A OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DA AMÔNIA.....	13
3.3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ANAMMOX.....	16
3.4 COEXISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ANAMMOX COM AS BACTÉRIAS AERÓBIAS OXIDADORAS DE AMÔNIA E DE NITRITO.....	20
3.5 REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL (RBS).....	23
3.6 TRABALHOS QUE FIZERAM O ENRIQUECIMENTO DE BACTÉRIAS ANAMMOX.....	26
3.7 ECOLOGIA MICROBIANA DAS BACTÉRIAS ANAMMOX.....	32
3.8 MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS.....	38
3.8.1 <i>Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	38
3.8.2 <i>Técnica da Hibridação in situ fluorescente (FISH)</i>	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 LODO DE INÓCULO PARA ENRIQUECIMENTO DE BACTÉRIAS ANAMMOX.....	43
4.2 MEIO DE CULTURA USADO NO ENRIQUECIMENTO DAS BACTÉRIAS ANAMMOX.....	44
4.3 MONTAGEM E CARACTERÍSTICAS DO REATOR.....	46
4.4 OPERAÇÃO E MONITORAMENTO DO REATOR.....	47
4.4.1 <i>Operação do reator</i>	47
4.4.2 <i>Monitoramento analítico do reator</i>	49
4.5 PROCEDIMENTO DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	50
4.5.1 <i>Determinação da amônia</i>	50
4.5.2 <i>Determinação do nitrito</i>	51
4.5.3 <i>Determinação da concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (STV)</i>	52
4.5.4 <i>Medição de pH</i>	53
4.6 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	54
4.7 HIBRIDAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH).....	55
4.8 REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	59
4.8.1 <i>Coleta e preservação da amostra</i>	59
4.8.2 <i>Extração de DNA</i>	60
4.8.3 <i>PCR com iniciadores específicos para bactérias anammox</i>	61
4.8.4 <i>PCR com iniciadores específicos para bactérias oxidadoras de amônia e nitrito</i>	63
4.9 CLONAGEM, SEQUENCIALMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LODO DE INÓCULO.....	67
5.2 EXPERIMENTO I.....	70
5.2.1 <i>Monitoramento analítico do reator</i>	70
5.2.2 <i>Detecção das bactérias anammox pela técnica da PCR</i>	74
5.2.3 <i>Detecção e quantificação das bactérias anammox pela técnica de FISH</i>	75
5.2.4 <i>Identificação filogenética da biomassa enriquecida</i>	76
5.3 EXPERIMENTO II.....	78
5.3.1 <i>Monitoramento analítico do reator</i>	78
5.3.2 <i>Detecção das bactérias anammox pela técnica da PCR</i>	84
5.3.3 <i>Detecção das bactérias nitrificantes pela técnica da PCR</i>	84
5.3.4 <i>Detecção e quantificação das bactérias anammox pela técnica de FISH</i>	89

5.4	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS I E II	96
6	CONCLUSÕES	98
7	RECOMENDAÇÕES	103
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
9	APÊNDICES	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Ciclo do Nitrogênio	09
Figura 3.2 – Provável rota metabólica da oxidação anaeróbia do amônio	15
Figura 3.3 – Esquema da estrutura secundária da molécula de RNAr 16S	41
Figura 4.1 (A) – Foto geral do sistema de Lodos Ativados da ETE Arrudas COPASA	44
Figura 4.1 (B) – Foto da etapa de recirculação do decantador secundário do sistema de Lodos Ativados da ETE Arrudas COPASA (vazão média de 1,86m ³ /s	44
Figura 4.2 – Representação esquemática do Reator em Batelada Sequencial	48
Figura 4.3 – Foto do fermentador operado como Reator em Batelada Sequencial usado para o enriquecimento de bactérias anammox	49
Figura 4.4 – Reação química da amônia com fenol para formar o indofenol na análise de amônia	50
Figura 4.5 – Reação química do nitrito com ácido sulfanílico e acoplamento do N-naftil para formar o azo corante na análise de nitrito	52
Figura 4.6 – Fluxograma de coleta de amostras para realização de análises de biologia molecular	54
Figura 4.7 – Representação esquemática da técnica de hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	57
Figura 4.8 – Marcador de peso molecular, <i>GeneRuler</i> de 1kb	62
Figura 4.9 – Marcador de peso molecular, <i>O'GeneRuler</i> de 100 pb	62
Figura 5.1 – Detecção pela PCR do DNAr 16s de anammox com iniciadores AN7F e AN1388R no lodo ativado usado como inóculo no RBS (3); (l) é o marcador de peso molecular (1kb - fermentas) e (nc) é o controle negativo da reação de PCR	68
Figura 5.2 – Detecção pela PCR do DNAr 16s de Planctomicetos com iniciadores PLA46F e EUB1392R no lodo ativado usado como inóculo no RBS; onde (t0) é o DNA extraído do lodo ativado (DNA concentrado), (d10x) é a amostra de DNA diluída 10 vezes extraída do lodo	

ativado, (Ld) é o marcador de peso molecular (1kb - fermentas) e nc é o controle negativo da reação da PCR69

Figura 5.3 – Concentração afluyente e efluente dos compostos nitrogenados ($N-NH_4^+$ E $N-NO_2^-$) no RBS ao longo do tempo de operação71

Figura 5.4 – Eficiência de remoção de amônia e nitrito pelo lodo cultivado no RBS ao longo do tempo de operação73

Figura 5.5 – Coeficiente estequiométrico do nitrito em relação à amônia, de acordo com os dados de consumo de nitrogênio do reator obtidos neste trabalho, ao longo do tempo de operação73

Figura 5.6 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de anammox com iniciadores An7F e An1388R (painel A), Pla46F e Amx820R (painel B), Pla46F e Amx1240R (painel C), e Pla46F e Amx667R (painel D). L é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (1) Lodo do RBS após 181 dias de enriquecimento (DNA diluído 10 vezes), (2) Lodo do RBS após 181 dias de enriquecimento (DNA concentrado); (3) lodo de inóculo; nc é o controle negativo da reação da PCR74

Figura 5.7 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de anammox com iniciadores Pla46F e Amx820R, onde (Ld) é o Marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t420) é o lodo do RBS após 420 dias de enriquecimento (DNA concentrado) e nc é o controle negativo da reação da PCR75

Figura 5.8 – Análise de FISH da biomassa cultivada no RBS após 181 dias de enriquecimento. Células coradas com DAPI em *a*; e células hibridadas com a sonda Amx1240 (específica para *Ca. Brocadia*) em *b*. a barra nas imagens *a* e *b* representa 10 μ m76

Figura 5.9 – Dendrograma de distância evolutiva mostrando a afiliação filogenética das sequências de 862 pb do gene RNAr 16s obtidas no presente trabalho a partir da biomassa do RBS (após 184 dias de enriquecimento), em relação aos membros do domínio bactéria. Os números nos nós da árvore representam a porcentagem de recuperação dos braços relevantes em 1000 análises de re-amostragens por “bootstrap”. O número de acesso das sequências depositadas no GenBank e no EMBL estão indicadas entre parênteses. A barra de escala representa a diferença estimada nas posições dos nucleotídeos das sequências77

Figura 5.10 – Árvore filogenética de anammox apresentando a posição dos clones JCA4 e JCA11, obtidos a partir do RBS após 184 dias de operação. A árvore foi construída utilizando fragmento de 862pb do gene RNAr 16S. Os números nos nós da árvore representam a porcentagem de recuperação dos braços relevantes em 1000 análises de re-amostragens por “bootstrap”. O número de acesso das sequências depositadas no GenBank e no EMBL estão indicadas entre parênteses. A barra de escala representa a diferença estimada nas posições dos nucleotídeos das sequências78

Figura 5.11 – Concentração afluyente e efluente dos compostos nitrogenados ($N-NH_4^+$ e $N-NO_2^-$) no RBS ao longo do tempo de operação para o ciclo de 7 horas de operação em batelada sequencial.	80
Figura 5.12 – Concentração afluyente e efluente dos compostos nitrogenados ($N-NH_4^+$ e $N-NO_2^-$) no RBS ao longo do tempo de operação para o ciclo de 17 horas de operação em batelada sequencial ...	80
Figura 5.13 – Eficiência de remoção de amônia e nitrito pelo lodo cultivado no RBS ao longo do tempo de operação para o ciclo de 7 horas de operação em batelada sequencial	82
Figura 5.14 – Eficiência de remoção de amônia e nitrito pelo lodo cultivado no RBS ao longo do tempo de operação para o ciclo de 17 horas de operação em batelada sequencial	82
Figura 5.15 – Coeficiente estequiométrico do nitrito em relação à amônia ($N-NO_2^-/N-NH_4^+$), em relação ao coeficiente estequiométrico padrão para o ciclo de 17 horas de operação em batelada sequencial	82
Figura 5.16 – (A) Detecção pela PCR do DNAr 16S de anammox com iniciadores Pla46F e Amx820R. Ld é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t80) Amostra de DNA extraída da biomassa enriquecida após 80 dias de cultivo, (t180) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 180 dias de cultivo, (t244) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 244 dias, (t347) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 347 dias	84
Figura 5.16 – (B) Detecção pela PCR do DNAr 16S de Planctomicetos com iniciadores Pla46F e Eub1392R. (t0) DNA extraído do lodo ativado utilizado como inóculo (DNA concentrado), (d10x) Amostra de DNA diluída 10 vezes extraída do Lodo ativado, nc é o controle negativo da reação	84
Figura 5.17 – Detecção pela PCR do gene <i>amoA</i> das bactérias oxidadoras aeróbias de amônia com iniciadores AmoA1F e AmoA2R. Ld é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t80) Amostra de DNA extraída da biomassa enriquecida após 80 dias de cultivo, (t160) Amostra de DNA da biomassa após 160 dias de cultivo, (t181) Amostra de DNA da biomassa após 181 dias, (t202) Amostra de DNA da biomassa após 202 dias, (t223) Amostra de DNA da biomassa após 223 dias, (t244) Amostra de DNA da biomassa após 244 dias, (t347) Amostra de DNA da biomassa após 347 dias, nc é o controle negativo da reação. A seta indica o produto de PCR com 500pb que é o fragmento de tamanho correto amplificado pelos iniciadores	86
Figura 5.18 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de bactérias oxidadoras aeróbias de nitrito com iniciadores NxrB1F e NxrB1R. Ld é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t160) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 160 dias de cultivo, (t244) Amostra de DNA da biomassa após 244 dias e (t347) Amostra de DNA da biomassa após 347 dias, nc é o controle negativo da reação	87

Figura 5.19 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de bactérias oxidadoras aeróbias de nitrito com iniciadores NSR1113F e NSR1246R. Ld é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t80) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 80 dias de cultivo, (t180) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 180 dias de cultivo, (t202) Amostra de DNA da biomassa após 202 dias de cultivo, (t223) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 223 dias de cultivo, (t244) Amostra de DNA da biomassa após 244 dias, (t347) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 347 dias de cultivo e nc é o controle negativo da reação 88

Figura 5.20 – Análise de FISH da biomassa cultivada no RBS após 80 (A), 160 (B), 202 (C) e 244 (D) dias de enriquecimento. Células coradas com DAPI em azul e células hibridadas com a sonda em vermelho. Sonda Amx1240 (específica para *Ca. Brocadia*) em A, C e D e sonda Amx820 (específica para os gêneros *Ca. Brocadia* e *Ca. Kueningenia*) em B91

Figura 5.21 – Análise de FISH da biomassa cultivada no RBS após 244 dias de enriquecimento. Células coradas com DAPI em azul (A) e células hibridadas com a sonda Nso190 (específica para a maioria das oxidadoras de amônia da Subclasse β -*Proteobacteria*, inclusive *Nitrosomonas*) em vermelho (B)91

Figura 5.22 – Análise de FISH da biomassa cultivada no RBS após 160 dias de enriquecimento. Células coradas com DAPI em azul (A) e células hibridadas com a sonda Ntspa662 (específica para *Nitrospira*) em vermelho (B)92

Figura 5.23 Diversidade Microbiana da biomassa desenvolvida no RBS ao longo do tempo, para os grupos bacterianos analisados pelo FISH com as respectivas sondas: *Nitrobacter* (sonda NIT3), *Nitrosomonas* (sonda Nso190), *Nitrospira* (sonda Ntspa662), Anammox (gêneros *Brocadia* e *Kueningenia* - sonda Amx820), Anammox (gênero *Brocadia* - sonda Amx1240)95

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Compostos inorgânicos de nitrogênio	07
Tabela 3.2 – Alguns processos biológicos do Ciclo do Nitrogênio	12
Tabela 4.1 – Composição do meio mineral autotrófico	45
Tabela 4.2 – Composição das soluções de micronutrientes	45
Tabela 4.3 – Características do inóculo, tempo e modo de operação em cada experimento	47
Tabela 4.4 – Frequência das análises do reator	49
Tabela 4.5 – Métodos analíticos utilizados	50
Tabela 4.6 – Frequência de coleta de amostras de biomassa no RBS	55
Tabela 4.7 – Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na análise de FISH	59
Tabela 4.8 – Condição de hibridação usada para cada sonda nas análises de FISH	59
Tabela 4.9 – Iniciadores utilizados para a detecção de bactérias anammox	61
Tabela 4.10 – Concentração dos reagentes da PCR para a detecção de bactérias anammox	63
Tabela 4.11 – Iniciadores utilizados para a detecção de bactérias oxidadoras de amônia e nitrito	64
Tabela 4.12 – Concentração dos reagentes da PCR para a detecção de bactérias anammox	65
Tabela 5.1 – Determinação do NMP de bactérias nitrificantes e desnitrificantes no lodo de inóculo pela técnica de tubos múltiplos	70
Tabela 5.2 – Porcentagem de células hibridadas na biomassa do RBS para os diferentes grupos bacterianos analisados em relação ao total de células coradas com DAPI	94
Tabela 5.3 – Resumo e comparação dos resultados obtidos na operação do RBS para os experimentos I e II realizados para o enriquecimento de bactérias anammox	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIA	Álcool Isoamílico
ANAMMOX	Anaerobic Ammonium Oxidation
ATP	Adenosina Trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BP	“Base pairs” - Pares de bases
BSA	Albumina de Soro Bovina
BRM	Biorreator de Membrana
CANON	Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAPI	4,6-diamidino-2-phenilindol
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization
HAO	Hidroxilamina Oxidoreductase
Kb	Kilobase

Ks	Constante de saturação
NMP	Número Mais Provável
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
OD	Oxigênio Dissolvido
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Salina Fosfato)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RBS	Reator em Batelada Sequencial
RDNA	Redução Desassimilatória do Nitrato a Íon Amônio
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAr	Ácido Ribonucléico ribossomal
rpm	Rotação por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
ST	Sólidos Totais
STV	Sólidos Totais Voláteis
TAE	Tris Acetato EDTA
Taq	Thermoaquaticus
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
TE	Tris-HCl EDTA
TEN	Tris-HCl EDTA NaCl
TRS	Tempo de Retenção de Sólidos
UASB	“Upflow Anaerobic Sludge Blanket” (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo)
ZMO	Zona de Mínimo Oxigênio

1 INTRODUÇÃO

A poluição por compostos nitrogenados e fosfatados tem emergido na atualidade como um problema grave que pode ocasionar desequilíbrio nos corpos d'água. Nitrogênio (N) e fósforo (P) são nutrientes essenciais para as células. Normalmente são elementos limitantes para o crescimento de plantas e algas na água, mas quando presentes em excesso são considerados poluentes e contribuem para o fenômeno de eutrofização, que pode levar a deterioração dos corpos d'água.

A eutrofização, que é o aumento da concentração de nutrientes, especialmente o nitrogênio e fósforo, nos ecossistemas aquáticos, pode ser natural (processo lento, porém contínuo) ou artificial (provocada pelo homem). Como decorrência deste processo, o ecossistema aquático passa da condição de oligotrófico e mesotrófico para eutrófico ou mesmo hipertrófico (ESTEVEZ, 1998). A eutrofização natural acontece constantemente nos corpos d'água, principalmente os tropicais. Águas provenientes do escoamento superficial e também dos rios e das bacias de drenagem, arrastam a matéria orgânica para dentro desses ecossistemas, contribuindo para este enriquecimento. Entretanto, devido à dinâmica das reações, a disponibilidade desses nutrientes é muito rápida e a ciclagem se dá de forma natural, por causa das altas temperaturas que aceleram os processos de produção, respiração e principalmente de decomposição (ESTEVEZ, 1998).

A eutrofização artificial é de origem antropogênica e consequência da utilização extensa de fertilizantes na agricultura, contaminando rios, lagos e mananciais, da descarga de esgotos industriais e domésticos sem nenhum tratamento, devido à alta taxa de urbanização e à falta de saneamento básico. Este enriquecimento artificial produz mudanças na qualidade da água, como a redução do oxigênio dissolvido, aumento do custo de tratamento da água para consumo, morte extensiva de peixes, decréscimo na diversidade de espécies da comunidade fitoplanctônica e aumento da incidência de florações de microalgas, especialmente de cianobactérias.

As principais fontes de nitrogênio orgânico lançado na natureza são o esgoto doméstico, os dejetos de animais e os efluentes altamente protéicos de certos processos industriais. Na forma de esgoto, tanto doméstico quanto industrial, o nitrogênio orgânico é rapidamente desaminado e a uréia é hidrolisada pela enzima urease para liberar amônia (GRAY, 1992).

A amônia é um composto importante, e às vezes pode ser tóxico ao ambiente, estando presente em diversos efluentes industriais e domésticos. No esgoto doméstico a concentração de nitrogênio amoniacal está em torno de $35 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, que é extremamente baixa quando comparada com outros efluentes ricos em nitrogênio, tais como efluentes de indústria frigorífica ($170 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, REGINATTO *et al.*, 2005), ou efluentes de coqueria ($300 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$). Não obstante, no que tange a saúde pública, o nitrato é agente causador da metahemoglobinemia (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 (BAIRD, 2002).

O valor permissível de nitrogênio amoniacal para lançamento de efluentes de qualquer fonte poluidora está temporariamente suspenso, segundo a Resolução N° 397/08 do CONAMA, a qual alterou o artigo 34 da Resolução N° 357/05 do CONAMA, que preconiza o teor máximo de lançamento em 20 mg/L . Já o teor de nitrogênio amoniacal total nos corpos hídricos depende da classe na qual este está enquadrado, podendo variar de $0,4$ a $13,3 \text{ mg N-NH}_4^+$, considerando a faixa de pH e alcalinidade apresentadas.

Sendo assim, a remoção de nitrogênio é um tema importante no tratamento de águas residuárias e tradicionalmente vem sendo efetuada por processos microbiológicos como nitrificação e desnitrificação. Essas reações são conhecidas desde muito tempo e vêm sendo aplicadas com sucesso na maioria dos sistemas modernos de tratamento de águas residuárias (EGLI *et al.*, 2001). As bactérias nitrificantes, tendo como principais representantes aquelas pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* são responsáveis, respectivamente, pela oxidação do íon amônio (NH_4^+) à nitrito (NO_2^-) e posteriormente, oxidação do nitrito à nitrato (NO_3^-), tendo o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons. Na desnitrificação, os íons nitrito e nitrato são reduzidos a nitrogênio gasoso (N_2) por bactérias desnitrificantes que utilizam NO_x^- como acceptor alternativo de elétron. A desnitrificação é realizada por amplo espectro de bactérias, uma vez que as mesmas estão dispersas em termos filogenéticos.

Até a década de 90, apenas processos aeróbios vinham sendo discutidos para a oxidação da amônia. Baseado em cálculos termodinâmicos Broda (1977) previu a existência de microrganismos capazes de oxidar a amônia utilizando o nitrito ou o nitrato como acceptor final de elétrons. Além disso, uma perda inexplicável de amônia sob condições anóxicas havia sido relatada na década anterior (RICHARDS, 1965 *apud* JETTEN *et al.*, 2009) em estudos a

respeito do balanço de nitrogênio em fiordes anóxicos. Mulder *et al.* (1995) verificaram perda de amônia sob condições anaeróbias em reator desnitrificante de leito fluidizado em Delft (Holanda), o qual tratava efluente de uma planta de produção de fermento. 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.

O processo biológico foi denominado de Anammox (**A**naerobic **A**mmonium **O**xidation), já que o mesmo converte amônia diretamente a nitrogênio gasoso sob condições anaeróbias, utilizando o nitrito como acceptor final de elétrons (MULDER *et al.*, 1995). Os organismos Anammox estão classificados no grupo dos Planctomicetos, cinco dos quais foram denominados provisoriamente de *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* (KARTAL *et al.*, 2006) e *Candidatus Jettenia asiatica* (QUAN *et al.*, 2008), que se constituem em um grupo interessante de bactérias com muitas propriedades raras ou únicas, por exemplo, possuem compartimentos internos delimitados por membranas, são anaeróbias, e se duplicam a cada 10 dias (aproximadamente).

A maioria das bactérias anammox ainda não foi isolada em cultura pura, portanto, técnicas moleculares são essenciais para o futuro das pesquisas com estes microrganismos (SCHMID *et al.*, 2005). A biologia molecular constitui uma poderosa ferramenta para o monitoramento ambiental e para caracterização da diversidade microbiana podendo efetivamente avaliar mudanças no ecossistema e melhorar a compreensão das comunidades microbianas envolvidas em processos vitais dentro de um ecossistema, ou, dentro de um sistema de tratamento. O uso de técnicas moleculares é assim, uma estratégia bastante promissora e aplicável para a investigação das bactérias anammox, portanto, as técnicas como a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são essenciais para o futuro das pesquisas com as mesmas (SCHMID *et al.*, 2005).

As bactérias anammox vêm sendo detectadas em vários ecossistemas marinhos e de água doce. Segundo Devol (2003) elas se mostraram muito importantes no ciclo oceânico do nitrogênio, sendo assim, as estimativas sugerem que estas bactérias poderiam ser responsáveis por 30 a 50% da produção total de N₂ no planeta. 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). Apesar da atividade anammox estar sendo inicialmente explorada em solos, a ampla ocorrência nos ecossistemas aquáticos sugere que este processo é onipresente, e é possível que bactérias anammox sejam encontradas em qualquer ecossistema que contenha nitrogênio e que possua zonas anaeróbias (FRANCIS *et al.*, 2007).

Diversas pesquisas demonstraram que uma eficiente retenção de biomassa é fundamental para o cultivo bem sucedido da biomassa anammox no reator, uma vez que estas possuem longo tempo de duplicação, e por conseguinte, pode ser necessário um longo tempo de partida dos reatores para que se atinja quantidade suficiente de biomassa. Nesse sentido o Reator em Batelada Sequencial (RBS) constitui uma ferramenta importante para o enriquecimento dos organismos Anammox por proporcionar a formação de biofilmes e efetuar considerável retenção de biomassa.

A aplicação do processo anammox para o tratamento de águas residuárias poderia levar à redução de até 90% dos custos operacionais (JETTEN *et al.*, 2001b). O processo se destina a águas residuárias que contêm muita amônia e pouca matéria orgânica. Nos sistemas de tratamento, o processo anammox substituiria completamente a etapa convencional de desnitrificação e economizaria metade dos custos com aeração na fase de nitrificação (JETTEN *et al.*, 1997). Além disso, como o processo é autotrófico, nenhuma fonte de carbono externa é requerida, e mais ainda, a emissão de gases do efeito estufa poderia também ser reduzida em cerca de 90%, uma vez que o processo consome CO₂, e não emite N₂O (KARTAL *et al.*, 2010). Pela aplicação inteligente do processo anammox no tratamento de águas residuárias municipais, as estações de tratamento poderiam ser convertidas de estações que consomem energia em sistemas produtores de energia (KARTAL *et al.*, 2010). Não obstante, a aplicação do processo Anammox, depende da disponibilidade de biomassa anammox e da dificuldade em manter grandes quantidades destas células. Nesse sentido, este trabalho se justifica na necessidade de se aprofundar no estudo destas bactérias e na sua utilização para a remoção de nitrogênio amoniacal de águas residuárias. Portanto, trabalhos que visam enriquecer esta população e possibilitar o desenvolvimento e manutenção desta biomassa para posteriormente servir de inóculo em reatores Anammox, são extremamente relevantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta pesquisa foi enriquecer (cultivar e aumentar a população) bactérias anammox a partir de lodo proveniente de um Sistema de Lodos Ativados (ETE ARRUDAS-COPASA) tratando esgoto sanitário da cidade de Belo Horizonte/ MG, e posteriormente caracterizar a biomassa desenvolvida no reator.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Produzir biomassa anammox através de cultivo em Reator em Batelada Sequencial (RBS) sob condições seletivas e apropriadas para estas bactérias, em dois experimentos distintos de enriquecimento e cultivo.
- Comparar dois experimentos de enriquecimento, a partir de um inóculo de mesma origem e mesmo reator, porém usando volume de inóculo e concentrações afluentes de amônia e nitrito diferentes. O sub-objetivo implícito aqui foi verificar se as comunidades microbianas enriquecidas seriam as mesmas, ou não, e se as condições operacionais do sistema interfeririam na dinâmica da comunidade microbiana enriquecida.
- Monitorar as concentrações de amônia e nitrito durante toda a operação do RBS, nos dois experimentos distintos, de modo a determinar a estequiometria da reação anammox para cada sistema, bem como adquirir melhor entendimento do processo de enriquecimento destas bactérias.
- Caracterizar e identificar a biomassa enriquecida no RBS, em cada um dos experimentos, por meio das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e hibridação *in situ* fluorescente (FISH).
- Identificar filogeneticamente a biomassa anammox enriquecida no RBS, em cada um dos experimentos, através de clonagem e seqüenciamento dos genes de RNAr 16S.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *O ciclo biogeoquímico do nitrogênio e suas formas presentes no ambiente*

O elemento químico nitrogênio (N) é um nutriente essencial para todos os organismos, e sendo componente crucial das proteínas, é fundamental para as estruturas e processos bioquímicos que definem a vida. O nitrogênio é de tal importância que tem-se sugerido ser ele, talvez, o melhor indicador da presença de vida em outros planetas (CAPONE *et al.*, 2006), porém a compreensão de como ocorre a ciclagem desse elemento na Terra mudou drasticamente nos últimos anos. O nitrogênio está presente no ambiente em vários estados de oxidação e diferentes formas químicas, e é rapidamente convertido por microrganismos no solo e no mar. Até recentemente, o ciclo global do nitrogênio havia sido idealizado como essencialmente direto em seu percurso de ida e volta no ambiente (FRANCIS *et al.*, 2007).

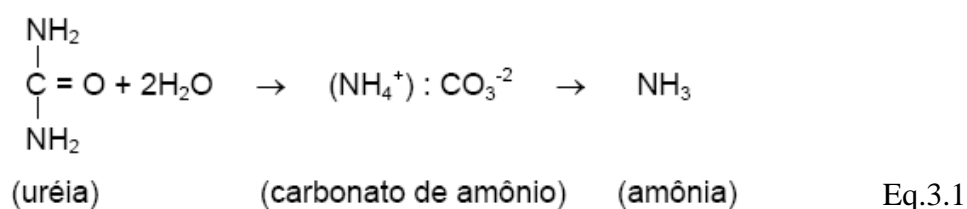
O nitrogênio é um elemento do grupo 5B e apresenta estados de oxidação que variam de -3 a +5 (Tabela 3.1). Em cada estado de oxidação o nitrogênio atômico se combina com átomos de hidrogênio, oxigênio ou outros átomos de nitrogênio. Desta forma, pelo menos, uma única molécula inorgânica existe para cada estado de oxidação. Apesar de algumas destas moléculas serem termodinamicamente mais estáveis do que outras, todos os estados de oxidação são possíveis em sistemas aquosos, uma vez que o estado de oxidação do nitrogênio em um determinado ambiente é controlado pela cinética da reação e não pelo equilíbrio termodinâmico, uma vez que a energia de ativação dos compostos nitrogenados é alta (JETTEN *et al.*, 2009).

A maior parte do nitrogênio presente na Terra está na forma de gás N₂, sendo o seu maior reservatório a atmosfera, constituindo 78% da mesma. Nessa forma de gás N₂ ele é quimicamente inerte e não pode ser usado diretamente como fonte de nitrogênio, exceto para algumas espécies de bactérias (VAN de GRAAF, 1997). Nos organismos vivos o nitrogênio é encontrado formando aminoácidos que compõem diversas proteínas, além de também estar presentes em outros compostos orgânicos como as bases nitrogenadas que formam os ácidos nucleicos. Após o carbono, o elemento mais abundante nas células corresponde ao nitrogênio. Uma célula bacteriana típica é composta por aproximadamente 12% de nitrogênio (de seu peso seco) (BROCK & MADIGAN, 2005).

Tabela 3.1 – Compostos inorgânicos de nitrogênio

Composto	Fórmula	Estado de oxidação
Amônio	NH ₄ ⁺	-3
Hidrazina	N ₂ H ₄ (aq)	-2
Hidroxilamina	NH ₂ OH (aq)	-1
Gás Nitrogênio	N ₂ (g)	0
Óxido Nitroso	N ₂ O (g)	+1
Óxido Nítrico	NO (g)	+2
Nitrito	NO ₂ ⁻	+3
Dióxido de Nitrogênio	NO ₂ (g)	+4
Nitrato	NO ₃ ⁻	+5

O nitrogênio é encontrado no ambiente tanto sob formas orgânicas quanto inorgânicas. As principais fontes de nitrogênio orgânico lançado na natureza são o esgoto doméstico, os dejetos de animais e os efluentes altamente protéicos de certos processos industriais. Na forma de esgoto, tanto doméstico quanto industrial, o nitrogênio orgânico é rapidamente desaminado e uréia é hidrolisada pela enzima urease para liberar amônia, uma espécie inorgânica (GRAY, 1992), conforme equação 3.1 a seguir:



Até o esgoto doméstico entrar no sistema de tratamento, 90% do nitrogênio presente está sob a forma de amônia ou na forma de componentes instáveis que são rapidamente transformados em amônia, devido à reação de amonificação, que em pH neutro encontra-se em meio aquoso como íon amônio (NH₄⁺) (GRAY, 1992). O esgoto doméstico apresenta concentração de nitrogênio amoniacal em torno de 35 mg N-NH₄⁺ .L⁻¹, que é extremamente baixa quando comparada com outros efluentes ricos em nitrogênio, tais como efluentes de indústria frigorífica com concentração média de 170 mg N-NH₄⁺ .L⁻¹ (REGINATTO *et al.*, 2005), ou

efluentes de coqueria que apresentam cerca de $550 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ (TOH & ASHBOLT, 2002).

Além da amônia o nitrogênio inorgânico também pode se apresentar na forma de íons nitrito (NO_2^-), o qual é instável e é rapidamente convertido em íon nitrato (NO_3^-). Ambos estão presentes tanto em sistemas naturais como em plantas de tratamento de águas residuárias. Há também liberação para a atmosfera dos gases óxido nítrico e óxido nitroso, os quais são gases que contribuem para o efeito estufa e portanto também estão envolvidos nas mudanças climáticas atuais. Por sua vez a hidrazina e a hidroxilamina são compostos intermediários no processo anammox (“**Anaerobic Ammonium Oxidation**” - oxidação da amônia sob condições anaeróbias). A hidrazina é primariamente utilizada como um produto químico intermediário na produção de insumos para a agricultura e antioxidantes. Além de ser um combustível para foguetes. Já a hidroxilamina e seus sais são normalmente usados como agentes de redução em uma variedade de reações orgânicas e inorgânicas. Eles podem também atuar como antioxidantes para ácidos graxos. Alguns usos não químicos da hidroxilamina incluem a remoção de pêlos de animais e soluções em fotografia. Além disso, a hidroxilamina pode atuar como agente mutagênico.

No contexto ambiental, conforme Von Sperling (2005), as espécies inorgânicas de nitrogênio podem ser agrupadas em nitrogênio total (N-total) e Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), os quais são formados pelas seguintes substâncias (Equações 3.2 e 3.3):

$$\text{N-total} = \text{N-amônia (NH}_4^+) + \text{N-orgânico} + \text{N-nitrito (NO}_2^-) + \text{N-nitrato (NO}_3^-) \quad \text{Eq.3.2}$$

$$\text{NTK} = \text{N-amônia} + \text{N-orgânico (predominante nos esgotos domésticos brutos)} \quad \text{Eq. 3.3}$$

Do ponto de vista microbiológico, a ciclagem dos compostos nitrogenados na biosfera (o ciclo do nitrogênio) é composta por cinco processos catabólicos (reações de degradação), os quais são: Nitrosificação, nitrificação, desnitrificação, redução desassimilatória de nitrato e processo anammox. Há também três processos anabólicos (reações de síntese), os quais são: Fixação de nitrogênio, redução assimilatória de nitrato e assimilação de amônia. Além do processo de amonificação, que ocorre como resultante biológico da cadeia alimentar (JETTEN *et al.*, 2009). O ciclo do nitrogênio é apresentado na figura 3.1.

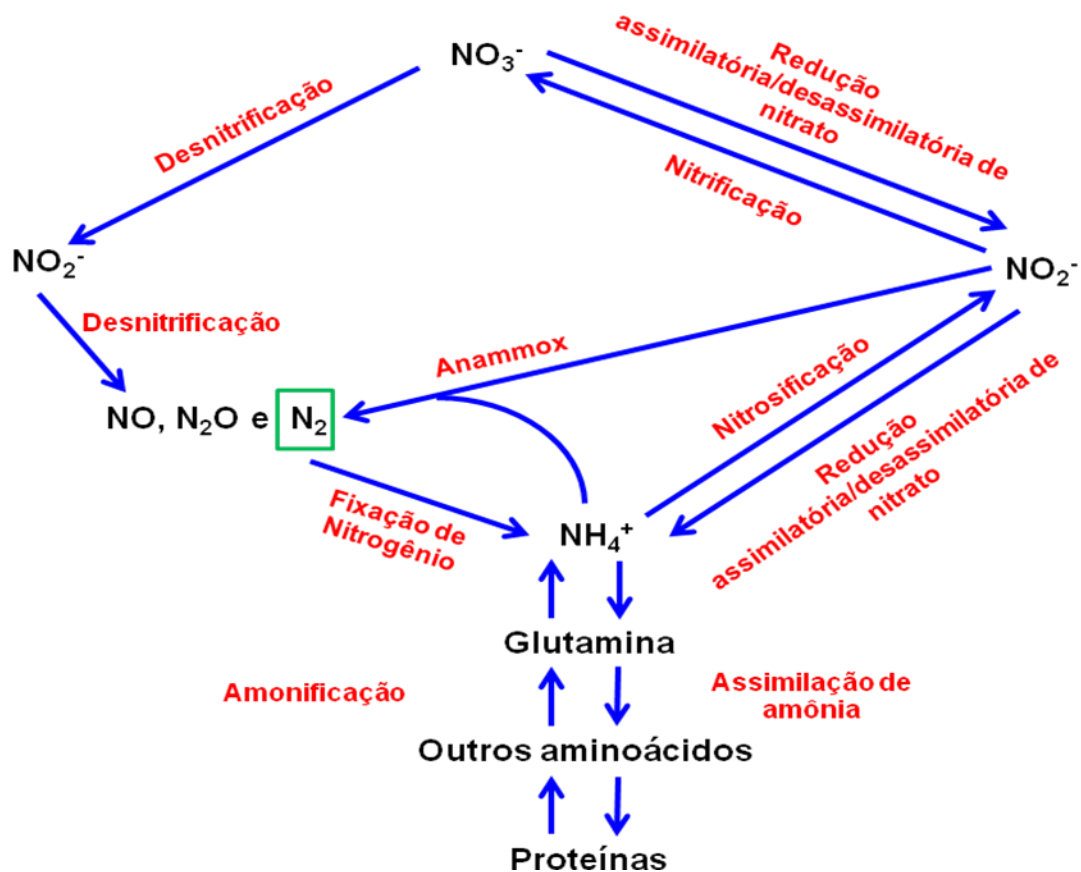


Figura 3.1 – Ciclo do Nitrogênio

A nitrosificação consiste na conversão de amônia a nitrito na presença de oxigênio, assim, as bactérias que realizam esse processo são denominadas nitrosificantes (produtoras de nitrogênio nitroso). Já a nitrificação é o processo subsequente, onde o nitrito é convertido a nitrato também na presença de oxigênio, sendo essa reação efetuada pelas bactérias nitrificantes (produtoras de nitrato) (BROCK & MADIGAN, 2005). Os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* correspondem aos principais gêneros de bactérias nitrosificantes e nitrificantes respectivamente. Historicamente, esses dois grupos de bactérias constituem os primeiros organismos onde o crescimento quimiolitotrófico foi observado. Winogradsky demonstrou que estas bactérias eram capazes de produzir matéria orgânica e massa celular quando o CO₂ era fornecido como única fonte de carbono. A maioria das bactérias nitrosificantes e nitrificantes é quimiolitotrófica obrigatória.

A desnitrificação consiste na transformação do nitrato em gás nitrogênio, processo esse realizado por bactérias desnitrificantes (BOTHE *et al.*, 2007). Estas são microorganismos anaeróbios, que utilizam como aceptores alternativos de elétrons o nitrato, o qual é reduzido a

N_2O , NO e N_2 . Como esses produtos da redução do nitrato são todos gasosos, são facilmente perdidos no ambiente, por essa razão, o processo é denominado desnitrificação, uma vez que este é um processo dissimilativo. O primeiro produto resultante da redução do nitrato é o nitrito (NO_2^-), o qual é reduzido a óxido nítrico (NO), pela enzima *nitrito redutase*. A bioquímica da redução dissimilativa do nitrato foi estudada detalhadamente em vários organismos, incluindo *Escherichia coli*, onde o NO_3^- é reduzido apenas a NO_2^- , além de *Paracoccus denitrificans* e *Pseudomonas stutzeri*, nas quais ocorre verdadeira desnitrificação. Em *P. denitrificans* e *P. Stutzeri* são formados óxido de nitrogênio a partir do nitrito, por meio de uma série de enzimas as quais incluem nitrato redutase, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase (BROCK & MADIGAN, 2005).

A redução desassimilatória do nitrato a íon amônio (RDNA) ocorre sob condições limitantes de oxigênio e tem a função de eliminar o excesso de potencial redutor ou gerar amônia para assimilação e crescimento celular anaeróbico (YE & THOMAS, 2001). É um processo de duas etapas, a primeira envolve a redução do nitrato a nitrito e é denominada respiração do nitrato. Esse passo inicial é acoplado à produção de energia na maioria dos organismos e, apesar de necessário, não é um passo limitante. O passo seguinte é a redução do nitrito a amônia, que é a etapa crítica da reação global. Ocorre em ambientes com excesso de compostos redutores, tais como sedimentos anaeróbios marinhos, fontes termais ricas em sulfeto (S^{2-}), trato gastrointestinal humano e nos organismos de animais de sangue quente (BOTHE *et al.*, 2007). Esse processo é regulado pelo oxigênio, mas não é afetado pelo íon amônio e o nitrogênio reduzido não é utilizado pela célula (KIELING, 2004).

O processo anammox envolve a oxidação anaeróbia do íon amônio a nitrogênio gasoso, sob condições anóxicas estritas usando o nitrito como acceptor final de elétrons (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996). A variação da energia livre de Gibbs associada com essa reação é ainda mais elevada do que aquela relacionada a oxidação aeróbia do íon amônio (Tabela 3.2), dando suporte ao crescimento autotrófico, como foi primeiramente observado por Broda (1977). Inicialmente acreditou-se ser o nitrato o acceptor de elétrons. Posteriormente o papel do nitrito foi reconhecido, possibilitando o enriquecimento e o estudo das bactérias anammox, responsáveis pelo processo (JETTEN *et al.*, 2009). A descoberta do processo anammox foi relevante por duas razões. Em primeiro lugar, o processo anammox é muito atraente para o tratamento de águas residuárias. Em segundo lugar, há quase um século, o ciclo do nitrogênio

era considerado completo, uma vez que a amônia não poderia ser oxidada sob condições anóxicas, assim a sua descoberta alterou essa concepção (BOTHE *et al.*, 2007).

O processo metabólico de fixação biológica de nitrogênio molecular atmosférico, que corresponde a uma redução do nitrogênio gasoso a íon amônio, é extremamente relevante para as plantas e animais, uma vez que fornece um composto nitrogenado assimilável pelos seres vivos (BROCK & MADIGAN, 2005). A fixação bacteriana do nitrogênio é um processo metabólico que necessita de energia para quebrar a ligação tripla do nitrogênio ($N\equiv N$). Tal processo pode também ocorrer quimicamente na atmosfera, por meio de descargas elétricas (relâmpagos), através da fixação industrial (indústria de fertilizantes) ou por processos de queima de combustíveis fósseis (KIELING, 2004). Porém, cerca de 85% da fixação de nitrogênio na Terra é de origem biológica (BROCK & MADIGAN, 2005).

A redução assimilatória do nitrato leva à formação do íon amônio, que será utilizado para a biossíntese celular. Este processo ocorre em duas etapas de conversão idênticas àquelas citadas na redução desassimilatória de nitrato. Porém, nesse caso, o processo se passa sob condições aeróbias e anaeróbias, não resultando em rendimento energético, e o produto, íon amônio, não é excretado para o meio (KIELING, 2004). A quantidade de nitrogênio reduzido é proporcional a necessidade celular para a geração de biomassa. Portanto, quando existe grande concentração do íon amônio, o processo é inibido ou torna-se insignificante (TIEDJE, 1988).

A assimilação da amônia consiste, inicialmente, na redução do nitrato a amônia. O íon amônio resultante da conversão é então incorporado aos compostos de carbono, principalmente, pela via que emprega as enzimas glutamina sintetase/glutamato sintase. Inicialmente, a amônia se combina com o glutamato formando a glutamina, que, então, origina outros aminoácidos, os quais vão se ligar formando cadeias protéicas (BOTHE *et al.*, 2007). A amonificação, por sua vez, consiste no processo oposto, onde compostos orgânicos nitrogenados são liberados de dentro da célula e, por meio de reações enzimáticas, os grupos amina são removidos formando a amônia. A tabela 3.2 apresenta a estequiometria dos processos biológicos que ocorrem durante o ciclo do nitrogênio, bem como a variação de energia livre envolvida.

Tabela 3.2 – Alguns processos biológicos do Ciclo do Nitrogênio

Processo	Reação	ΔG^0 (kJ.mol ⁻¹)
Nitrosificação	$\text{NH}_4^+ + 1,5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-290,4
Nitrificação	$\text{NO}_2^- + 0,5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$	-72,1
Desnitrificação	$\text{NO}_3^- + 1,25\{\text{CH}_2\text{O}\} + \text{H}^+ \rightarrow 0,5\text{N}_2 + 1,75\text{H}_2\text{O} + 1,25\text{CO}_2$	-594,6
Redução desassimilatória/assimilatória de nitrato	$\text{NO}_3^- + 2\{\text{CH}_2\text{O}\} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-655
Anammox	$\text{NH}_4^+ + 1,32\text{NO}_2^- + 0,066\text{HCO}_3^- + 0,13\text{H}^+ \rightarrow 1,02\text{N}_2 + 0,26\text{NO}_3^- + 0,066\text{CH}_2\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,15} + 2,03\text{H}_2\text{O}$	-358
Fixação do nitrogênio	$0,5\text{N}_2 + 1,5\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$	-39,4

Fonte: BROCK & MADIGAN, 2005; BOTHE *et al.*, 2007; KIELING, 2004; STROUS *et al.*, 1998.

Inicialmente, a principal aplicação do ciclo biológico do nitrogênio foi para compreender e melhorar a eficácia da fertilização na agricultura. Até a década de 1960 o potencial das bactérias nitrificantes e desnitrificantes para a remoção de nutrientes de efluentes não era reconhecida, e pesquisas voltadas para melhorar a remoção de nitrogênio de águas residuárias estavam sendo iniciadas. Na década de 1980, a contribuição dos óxidos de nitrogênio para a destruição da camada de ozônio e para o aquecimento global foi reavaliada. Assim o papel da nitrificação e da desnitrificação na geração desses compostos voltou a incentivar pesquisas com foco ambiental, no que se refere ao ciclo do nitrogênio (JETTEN *et al.*, 2009).

No entanto, os últimos 10 anos deixaram claro que os conhecimentos acerca do ciclo microbiológico do nitrogênio e os seus principais participantes estão longe de estarem completos (JETTEN, 2008). Descobertas relevantes foram feitas nesse período, tais como a oxidação anaeróbia da amônia (anammox) (JETTEN *et al.*, 1998;. STROUS *et al.*, 1999a), oxidação da amônia por *Crenarchaea* (Arquéias Oxidadoras de Amônia - AOA) (KOENNECKE *et al.*, 2005;. FRANCIS *et al.*, 2007), a interação entre estes dois grupos

(LAM *et al.*, 2007), além do sequenciamento do genoma de vários organismos participantes do ciclo do nitrogênio (STARKENBURG *et al.*, 2006; STROUS *et al.*, 2006; ARP *et al.*, 2007). Tudo isso exemplifica a idéia de que há uma enorme biodiversidade e variedade metabólica nas rotas de conversão do nitrogênio, e que muito ainda está oculto no mundo microbiano, do qual se conhece muito pouco até agora (JETTEN, 2008).

Por outro lado, houve grande aumento na combustão de combustíveis fósseis e na demanda por nitrogênio para uso agrícola e industrial, indicando que a humanidade continua a empregar as transformações do ciclo do nitrogênio em ritmo elevado (GALLOWAY *et al.*, 2008). Grandes quantidades de nitrogênio antropogênico são lançadas ao ambiente e ocasionando uma série de problemas, como por exemplo, o aumento dos níveis de nitrato nos corpos d'água e grande produção de óxido nitroso, o qual pode acelerar as mudanças climáticas globais (DUCE *et al.*, 2008). Sendo assim, um melhor conhecimento a respeito dos microrganismos envolvidos nas transformações do nitrogênio é necessário para se compreender e, eventualmente, evitar os efeitos negativos da poluição ocasionada por compostos nitrogenados (JETTEN *et al.*, 2009). Neste contexto, o presente trabalho concentra-se em uma das descobertas recentes, acima mencionadas, acerca do ciclo do nitrogênio: a oxidação anaeróbia de amônia (anammox). Desde sua descoberta em 1995, o processo anammox evoluiu de um segmento inexplorado da ciclagem biológica do nitrogênio para uma alternativa promissora de remoção de compostos nitrogenados de águas residuárias. Portanto, tornou-se claro que as bactérias anammox são microrganismos relevantes no ciclo global do nitrogênio.

3.2 Bactérias anammox e a oxidação anaeróbia da amônia

A maioria das pesquisas a respeito da remoção de nitrogênio em águas residuárias, até meados da década de 90, se concentrava nos processos clássicos de nitrificação e desnitrificação. Porém, Mulder *et al.* (1995) verificaram consumo de amônia sob condições anaeróbias em reator desnitrificante de leito fluidizado, operado para o tratamento de resíduos de uma planta de produção de fermento em Delft (Holanda). O processo biológico foi designado de anammox, pois converte amônia diretamente a nitrogênio gasoso sob condições anaeróbias, utilizando o nitrito como acceptor final de elétrons (MULDER *et al.*, 1995):



Richards (1965) constatou uma perda de amônia inexplicável, sob condições anóxicas, em estudos de balanço de nitrogênio em Fiordes anóxicos. Broda (1977) já havia previsto a existência de uma bactéria quimiolitotrófica capaz de oxidar amônia para N₂ gasoso, com base em cálculos termodinâmicos. Porém, até a constatação do processo anammox (MULDER *et al.*, 1995) nenhum pesquisador havia verificado a ocorrência desta bactéria no ambiente ou em qualquer sistema de engenharia. Van de Graaf *et al.* (1996) demonstraram a presença dessa bactéria autotrófica capaz de efetuar a reação anammox em um reator de leito fluidizado em escala laboratorial, o que tornou claro que o enriquecimento das mesmas deve ser realizado utilizando nitrito e não nitrato. Posteriormente, Strous *et al.* (1999a) purificaram (fisicamente por centrifugação em gradiente com percoll) esta bactéria a partir de biomassa enriquecida de um sistema em bateladas sequenciais que estava removendo nitrogênio pelo processo anammox. Os autores demonstraram que as células purificadas foram capazes de oxidar amônia anaerobiamente quando incubadas na presença de 5mM de amônio e 5mM de nitrito.

A partir da amplificação do gene RNA ribossomal (RNAr)16S desta bactéria e posterior seqüenciamento, a mesma foi identificada filogeneticamente como sendo membro da ordem *Planctomycetales*, denominada de *Candidatus Brocadia anammoxidans* (STROUS *et al.*, 1999b). Este novo membro apresenta um crescimento lento, a divisão celular ocorre aproximadamente a cada 10 ou 14 dias (STROUS *et al.*, 1998). Não obstante, alguns autores (PARK *et al.*, 2010) verificaram que o tempo de duplicação das anammox pode ser inferior à esse valor. Em um reator em Batelada Sequencial verificaram que as anammox se duplicaram a cada 5,3 dias, enquanto que as mesmas, enriquecidas em um sistema CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite*), apresentaram tempo de duplicação de 8,9 dias (PARK *et al.*, 2010). Até o presente momento, as bactérias anammox não puderam ser isoladas utilizando as técnicas tradicionais de cultivo (como plaqueamento em meio seletivo). Entretanto, podem ser detectadas e estudadas através de ferramentas de biologia molecular tais como, a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) usando sondas específicas para este grupo, e a técnica de amplificação em cadeia da DNA polimerase (PCR) com iniciadores específicos.

Para esclarecer a rota metabólica de conversão da amônia a nitrogênio gasoso sob anaerobiose Jetten *et al* (2002), baseados em experimentos com ¹⁵N, postularam o seguinte mecanismo para a oxidação anaeróbia da amônia: a bactéria autotrófica responsável pelo processo

anammox reduz nitrito (NO_2^-) a hidroxilamina (NH_2OH). Em seguida, hidroxilamina e amônio (NH_4^+) são condensados a hidrazina (N_2H_4) e água. Posteriormente, a hidrazina é oxidada a nitrogênio gasoso (N_2) e os elétrons são utilizados para reduzir a próxima molécula de nitrito (conforme Figura 3.2). Além disso, parte do nitrito é convertida a nitrato, o que produz equivalentes de redução para fixação do CO_2 e conseqüentemente, aumento da biomassa.

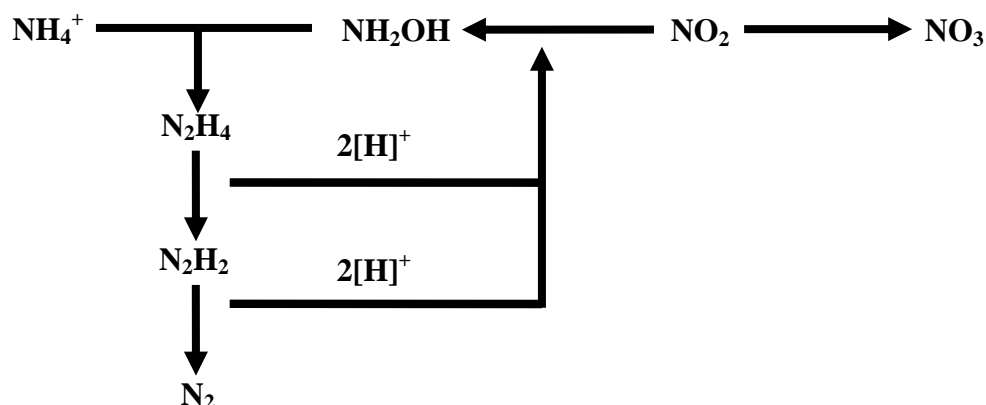
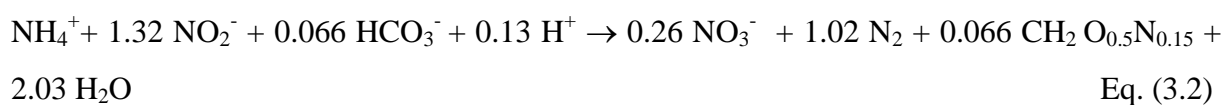


Figura 3.2 – Provável rota metabólica da oxidação anaeróbica do íon amônio

Estudos com microscopia eletrônica de transmissão de *B. anammoxidans* mostraram que estão presentes no citoplasma desta bactéria vários compartimentos limitados por membranas. A enzima hidroxilamina oxidoreductase (HAO), que é responsável pela oxidação de hidrazina a gás N_2 , estava presente exclusivamente dentro de um desses compartimentos, denominado de “anammoxosomo” (JETTEN *et al.*, 2001a). A membrana do anammoxosomo é usada para gerar e manter uma força motriz de prótons para a síntese de ATP, além de isolar os intermediários do processo anammox, os quais são tóxicos (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004). As condições ambientais para as anammox foram determinadas por Strous *et al.* (1999b). A temperatura de crescimento ocorreu entre 20 e 43°C (sendo a temperatura ótima de 40°C), e pH na faixa de 6,7 – 8,7 (com pH ótimo igual a 8). Concentrações de amônio e nitrato entorno de 100mM não inibiram o processo anammox. Porém, concentrações de nitrito acima de 20mM (280mg de $\text{N-NO}_2^-/\text{m}^3$) inibiram o processo, sendo que concentrações maiores que 10mM já se mostraram desfavoráveis.

Além disso, quando a concentração de nitrito permaneceu acima de 5mM (70mg de $\text{N-NO}_2^-/\text{m}^3$) por longo período (12h), a atividade anammox foi completamente inibida, sendo recuperada pela adição de quantidades traço de hidrazina e hidroxilamina, reforçando a idéia

de que o processo anammox é fortemente estimulado pelos intermediários da reação. A afinidade pelos substratos amônio e nitrito é relativamente alta (com constantes de afinidade menor que 10 μ M), e a biomassa revelou-se estritamente anóxica, evidenciando perda completa de atividade (mas de forma reversível), mesmo em concentrações muito baixas de oxigênio, < 2 μ M (STROUS *et al.*, 1999b). Portanto, as bactérias anammox têm sido descritas como anaeróbias estritas, capazes de fixar CO₂ com nitrito como acceptor de elétrons, levando a produção anaeróbia de nitrato (STROUS *et al.*, 1999b). O balanço total de nitrogênio apresentou proporção de 1: 1,32: 0,26 para a conversão de amônio e nitrito e produção de nitrato (STROUS *et al.*, 1998). A equação geral da reação anammox, proposta pelos referidos autores, seria:



3.3 Diversidade de bactérias anammox

Desde a identificação de *Candidatus Brocadia anammoxidans* como a primeira bactéria responsável pelo processo anammox, outros gêneros de bactérias relacionadas ao processo já foram descobertas. A descoberta da viabilidade da conversão anaeróbia de amônia em nitrogênio gasoso, utilizando o nitrito como acceptor final de elétrons, revigorou os esforços para determinar se o processo anammox seria importante no controle das distribuições de compostos nitrogenados no ecossistema marinho e veio como possível explicação para certos fenômenos oceânicos (ARRIGO, 2005).

Há alguns anos pesquisadores notaram que a maior parte do nitrogênio amoniacal que deveria ter sido produzido pela remineralização anaeróbia da matéria orgânica, em ambiente marinho, estava ausente e não foi encontrada explicação para este fato. Então, foi proposto que o nitrogênio amoniacal “perdido” poderia ter sido oxidado anaerobiamente a N₂ por algum microrganismo utilizando o nitrato como agente oxidante. Esta teoria recebeu pouca atenção porque não existiam rotas biológicas conhecidas para esta transformação até a descoberta do processo anammox (ARRIGO, 2005). Thamdrup e Dalsgaard (2002) investigaram a presença de bactérias anammox em sedimentos marinhos do mar Báltico e encontraram que este processo respondia por 24 a 67% da produção total de nitrogênio gasoso neste local. A

desnitrificação respondia pelo restante da produção. Estas análises forneceram as primeiras evidências claras de que a atividade anammox poderia ser detectada em diferentes habitats naturais.

Kuypers *et al.* (2003) identificaram no Mar Negro, a maior bacia anóxica do mundo, a ocorrência de atividade anammox. Segundo suas conclusões, a amônia ascendente de águas anóxicas profundas é consumida por bactérias anammox abaixo da zona aeróbia. Estas observações forneceram fortes evidências de que bactérias anammox são responsáveis pela oxidação anaeróbia do nitrogênio amoniacal no Mar Negro. A atividade destas bactérias foi suficiente para oxidar todo o nitrogênio amoniacal difuso na camada anóxica. Esta foi a primeira vez que as bactérias anammox foram identificadas e relacionadas diretamente à remoção de nitrogênio na natureza. Ainda para Kuypers *et al.* (2003) a ampla ocorrência destas espécies em zonas subóxicas no ecossistema marinho indica que as bactérias anammox são um grupo importante no ciclo do nitrogênio.

Nas grandes zonas de ressurgência, tais como a costa do Peru, Chile, Costa Rica, Angola e Namíbia, águas frias e ricas em nutrientes atingem a zona fótica proporcionando elevada produção primária e, conseqüentemente, elevadas taxas de mineralização, incluindo altas taxas de transformação de nitrogênio (KUENEN *et al.*, 2003). Algumas das primeiras evidências de reações anammox em águas anóxicas vieram do Golfo Dulce, Costa Rica. Dalsgaard *et al.* (2003) mostraram que a deficiência de nitrogênio amoniacal em águas pobres em oxigênio era devida à combinação entre desnitrificação e a atividade anammox, sendo que a desnitrificação fornecia o nitrito requerido para a reação anammox. Durante este estudo, o processo anammox se mostrou responsável por 19 a 35% da produção total de nitrogênio gasoso, e em algumas profundidades esse valor atingiu 58% da produção total. Foi estimado que o processo anammox, em zonas pobres em oxigênio gasoso, é responsável por 10 a 15% da perda de nitrogênio fixado nos oceanos do mundo (DALSGAARD *et al.*, 2003). Também foi sugerido que o processo anammox pode ser ainda mais importante em regiões tais como as zonas de ressurgência do Chile e Peru, onde águas anóxicas ricas em nitrato encontram sedimentos que produzem quantidades significativas de nitrogênio amoniacal.

Águas profundas na zona de ressurgência de Benguela, Angola, tornam-se subóxicas devido à decomposição da matéria orgânica sedimentada, oriunda das temporadas de alta produtividade. A baixa relação entre nitrogênio e fósforo nestas áreas subóxicas vinha sendo

atribuída à desnitrificação. Entretanto, as baixas concentrações de nitrato e nitrogênio amoniacal nestas águas sugerem que as bactérias anammox desempenham um papel importante. Kuypers *et al.* (2005) desvendaram essa atuação dos organismos anammox por meio da utilização de isótopos marcados ^{15}N que detectaram significativa atividade de oxidação anaeróbia de amônia. Este trabalho verificou que a perda de nitrogênio fixado é devida à atividade anammox. Estas pesquisas demonstraram que na Zona de Mínimo Oxigênio (ZMO) do sistema de ressurgência de Benguela apenas uma pequena fração do nitrogênio gasoso é produzido pela desnitrificação, sendo, portanto, as bactérias anammox as principais protagonistas da produção de nitrogênio gasoso (KUYPERS *et al.*, 2005).

Os ambientes extremos também tem sido foco de pesquisas em busca da presença de microrganismos anammox. Estudos mais recentes reportaram atividade anammox em ecossistemas marinhos tão diversos quanto o gelo polar. Rysgaard e Glud (2004) identificaram bactérias anammox em camadas de gelo marinho em fiordes na Groelândia. Segundo esta pesquisa, as anammox contribuíam com 19% da produção total de nitrogênio gasoso nas camadas mais profundas do gelo, mostrando que este grupo de organismos pode ter papel importante no ciclo dos nutrientes em regiões polares.

Além da busca por bactérias anammox em sedimentos oceânicos, coluna d'água e gelo polar, lugares mais remotos estão sendo explorados e se mostrando habitas para a ocorrência destes microrganismos. Byrne *et al.* (2009) encontraram bactérias anammox em respiradouros oceânicos, também conhecidos como “chaminés”, a profundidades variando de 750 a 3650 metros e em temperaturas variando de 30 a 300°C . Durante três expedições oceanográficas para a dorsal Meso-Atlântica, amostras hidrotermais foram coletadas em cinco respiradouros oceânicos. Essas amostras foram analisadas em relação à presença de organismos anammox. O resultados apontaram a presença de lipídios laderanos (específicos das bactérias anammox) e sequências de genes de RNAr 16S de microrganismos anammox em quatro dos cinco respiradouros oceânicos estudados, além da detecção de atividade anammox nas amostras desses quatro respiradouros. Não obstante, em duas dessas amostras foram encontradas sequências genéticas que sugerem um grupo novo de bactérias anammox. Assim, os resultados de Byrne *et al.* (2009) sugerem que estes organismos são importantes também para o ciclo do nitrogênio nas profundezas oceânicas.

Bactérias anammox vêm sendo também encontradas em várias amostras de solos e sedimentos, tais como sedimentos marinhos, costeiros, estuarinos e de águas doces, além de mangues, lagos de água doce, permafrost, entre outros. Meyer *et al.* (2005) estudaram a correlação entre possível atividade anammox e a distribuição de nitrito em sedimentos de mangues subtropicais na Austrália e sugerem que o acúmulo de nitrito, devido à atividade nitrificante, pode criar condições para a ocorrência das anammox. No Lago Tanganyika, o segundo maior lago do planeta, Schubert *et al.* (2006) verificaram que aproximadamente 13% da produção de nitrogênio gasoso no lago poderia ser atribuída à atividade anammox.

Já Humbert *et al.* (2010) relataram a detecção de seqüências anammox de *Candidatus Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua* e *Jettenia* em pântanos, em margens de lagos, em um aquífero poroso contaminado, em solo permafrost, solo agrícola e em amostras associadas a plantas fixadoras de nitrogênio. Humbert *et al.* (2010) sugeriram que existe maior diversidade de bactérias anammox em ambientes terrestres quando comparada com ecossistemas marinhos e que esta pode ser consequência da maior variedade de nichos adequados em solos. Os autores reforçaram que os organismos anammox não estavam presentes de forma ubíqua, uma vez que só foram detectados em determinados tipos de solo e em profundidades específicas, refletindo, assim, as exigências ecológicas específicas desse grupo.

No que se refere ao tratamento de águas residuárias resultados utilizando a técnica de FISH com sondas específicas para essas bactérias revelaram enorme abundância *in situ* da bactéria *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* em biofilmes de reatores tipo biodiscos rotatórios, em Stuttgart (Alemanha) (SCHMID *et al.*, 2000), sugerindo que pelo menos dois gêneros (*Kuenenia* e *Brocadia*) dentro da ordem *Planctomycetales* são capazes de catalisar o processo anammox em sistemas de tratamento. Além disso, novas espécies de bactérias anammox foram enriquecidas a partir de amostras coletadas em sistemas de tratamento de águas residuárias. Kartal *et al.* (2007) descreveram uma nova espécie de anammox, com um nicho bem definido: a co-oxidação de propionato além do nitrogênio amoniacal, a qual foi denominada de *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*. Já em outro trabalho, Kartal *et al.* (2008) investigaram o enriquecimento de bactérias anammox na presença de acetato, e os resultados apontaram para a descoberta de outra nova espécie anammox, denominada *Candidatus Brocadia fulgida*. Já Hu *et al.* (2010) detectaram bactérias anammox em oito reatores diferentes que removiam nitrogênio. Em cinco dos oito reatores foi constatada a

existência de uma espécie nova, afiliada ao gênero *Brocadia*, a qual foi denominada de *Candidatus Brocadia sinica*.

Apesar da atividade anammox, ainda estar por ser pesquisada em solos, a ampla ocorrência dessas bactérias nos ecossistemas aquáticos e sistemas de tratamento de águas residuárias sugere que este processo seja ubíquo, e é possível que as anammox sejam encontradas virtualmente em qualquer ecossistema que contenha nitrogênio amoniacal com zonas anaeróbias (FRANCIS *et al.*, 2007). Em escala global a contribuição total do processo anammox para a perda de nitrogênio fixado é ainda incerta. Segundo Devol (2003) estimativas sugerem que estas bactérias poderiam ser responsáveis por 30 a 50% da produção total de nitrogênio gasoso no planeta.

3.4 Coexistência das bactérias anammox com as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia e de nitrito

A nitrificação é uma etapa importante do ciclo biológico do nitrogênio, e os microrganismos envolvidos no processo são caracterizados como bactérias litoautotróficas e oxidadoras aeróbias de amônia e nitrito. As bactérias nitrificantes pertencem à família *Nitrobacteraceae*, tendo como principais gêneros representantes, *Nitrosomonas* (oxida amônia a nitrito) e *Nitrobacter* (oxida nitrito a nitrato). Estudos recentes têm investigado a coexistência das bactérias aeróbias oxidadoras de amônia e nitrito com as bactérias anammox. Schmidt *et al.* (2002) sugeriram que em vários ecossistemas *Candidatus B. anammoxidans* é dependente da atividade de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia, sob condições limitantes de oxigênio. Esse fato foi constatado na interface aeróbia/anóxica da biomassa em estações de tratamento de águas residuárias na Holanda, Alemanha, Suíça, Reino Unido, Austrália e Japão (JETTEN, 2001b *apud* SCHMIDT *et al.*, 2002). Os ambientes que apresentam interfaces aeróbia/anóxica são abundantes na natureza, por exemplo, em biofilmes e flocos microbianos. Sendo assim, nesses locais onde o oxigênio é limitado as oxidadoras aeróbias de amônia oxidam o nitrogênio amoniacal a nitrito, mantendo a concentração de oxigênio baixa, enquanto *Ca. B. anammoxidans* converte o nitrito produzido e o restante do nitrogênio amoniacal em nitrogênio gasoso (SCHMIDT *et al.*, 2002).

As análises pela técnica da Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e as medições de atividade mostraram que as bactérias oxidadoras aeróbias de amônia, assim como as anammox, estavam

presentes e foram atuantes nesses reatores onde havia limitação de oxigênio, porém as bactérias oxidadoras de nitrito (*Nitrobacter* ou *Nitrospira*) não foram detectadas (SCHMIDT *et al.*, 2002). Aparentemente, as oxidadoras aeróbias de nitrito são incapazes de competir pelo oxigênio, com as oxidadoras aeróbias de amônia, e pelo nitrito, com as bactérias anammox. Segundo Schmidt *et al.*(2002), parece provável que nestas condições de oxigênio limitante as bactérias oxidadoras de amônia aeróbias e anaeróbias formem uma comunidade bastante estável. A cooperação entre esses dois grupos de oxidadoras de nitrogênio amoniacal não é relevante apenas para o tratamento de águas residuárias, mas pode desempenhar papel importante em ambientes naturais na interface aeróbia/anóxica (JETTEN *et al.*, 2001b).

A cooperação entre os grupos aeróbios e anaeróbios de bactérias oxidadoras de amônia, sob condições limitantes de oxigênio, também foi observado por Sliemers *et al.* (2001). Os autores investigaram os microrganismos envolvidos e a viabilidade de um novo reator operando em fase única, com a remoção de amônia sendo completamente autotrófica. A partida do reator foi dada pela inoculação usando biomassa de um reator anammox. Posteriormente, o oxigênio foi fornecido ao reator e a população de bactérias nitrificantes se desenvolveu, a qual foi monitorada pela técnica de FISH. O oxigênio foi mantido como o fator limitante. Os resultados mostraram que durante o estado estacionário, as bactérias anammox continuaram presentes e ativas. Sendo que, neste reator não foram detectadas bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito. Portanto, a cooperação entre oxidadoras aeróbias e anaeróbias de amônia resultou em conversões de amônia, principalmente, a nitrogênio gasoso (85%) e uma pequena parcela a nitrato (15%).

Sendo assim, a interação de bactérias aeróbia e anaeróbias oxidadoras de amônia, sob condições limitantes de oxigênio, tem resultado em uma conversão quase que completa de amônia em gás nitrogênio. A excessiva liberação de nitrogênio na forma de nitrogênio gasoso tem sido relatada em diversos sistemas de tratamento que recebem águas residuárias com carga de nitrogênio amoniacal elevada e pequena concentração de carbono orgânico (HELMER *et al.*, 2001.; HELMER & KUNST, 1998; HELMER *et al.*, 1999;. HIPPEN *et al.*, 1997;. SIEGRIST *et al.*, 1998). A conversão autotrófica da amônia à nitrogênio gasoso foi definida em termos microbiológicos (STROUS *et al.*, 1997), e o processo foi denominado CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite*), que consiste em uma remoção de nitrogênio completamente autotrófica em presença de nitrito (DIJKMAN &

STROUS, 1999). A remoção de amônia realizada em um único reator representa uma opção eficiente e econômica para o tratamento de águas residuárias, especialmente para efluentes ricos em amônia, mas desprovidos de matéria orgânica (THIRD *et al.*, 2001).

Third *et al.* (2001) sugeriram que o processo CANON depende da interação estável entre estas duas populações bacterianas: *Nitrosomonas*, como oxidadora aeróbia de amônia, e bactérias anammox. Neste trabalho os autores investigaram o efeito de longos períodos de limitação de amônia em dois tipos diferentes de reatores (batelada e quimiostato). O limite inferior de nitrogênio que propiciou remoção estável e eficaz de nitrogênio amoniacal foi de 0,1 kg N/m³. dia. Com essa taxa de carregamento, houve remoção de 92% do nitrogênio total. Após exposição prolongada (maior que um mês) a uma carga afluyente de amônia inferior a esta, houve o desenvolvimento de uma terceira população bacteriana no reator, que afetou a estequiometria da reação CANON, resultando em redução temporária da remoção de nitrogênio amoniacal de 92% para 57%. O terceiro grupo de bactérias foi identificado por testes de atividade e análises qualitativas de FISH, indicando serem estas bactérias oxidadoras de nitrito dos gêneros *Nitrobacter* e *Nitrospira*. As mudanças causadas pela limitação de nitrogênio amoniacal foram completamente reversíveis, e o sistema se restabeleceu assim que a carga afluyente de amônia voltou ao normal. Este estudo mostrou que o sistema CANON é um sistema robusto para a remoção de amônia, e que períodos duradouros de até um mês de limitação de amônio não causam danos irreversíveis.

Dong & Sun (2007) analisaram a coexistência da nitrificação parcial e do processo anammox em *Wetlands* construídas, de fluxo vertical, tratando águas residuárias na França. Segundo os autores, estudos preliminares haviam sugerido que além da nitrificação e desnitrificação outras vias microbiológicas de remoção de nitrogênio atuaram nas *Wetlands*, como a nitrificação parcial de amônia a nitrito associada ao processo anammox. A realização de experimentos em grande escala, com duração de cerca de 100 dias, mostrou que, com alterações apropriadas no projeto das *Wetlands*, tais como a modificação da profundidade convencional de 80 cm para uma estrutura composta por duas camadas (camada de 25 cm insaturada e camada de 55 cm saturada), o novo modelo não apenas permitiu a obtenção de melhor desempenho na eficiência de remoção de nitrogênio total, mas também promoveu o crescimento das bactérias anammox. Análises de FISH indicaram que as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia coexistiram na interface entre as duas camadas (saturada e instaurada). Os resultados sugeriram que os dois processos, oxidação aeróbia e anaeróbia da amônia,

foram realizados em vias completamente diferentes, e que a ocorrência simultânea de ambos resultou em maior eficiência de remoção de nitrogênio total quando comparado aos métodos convencionais (DONG & SUN, 2007).

Assim, a coexistência de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia com bactérias anammox ilustra a descoberta de novos caminhos microbiológicos no ciclo do nitrogênio. A flexibilidade do metabolismo aeróbio das bactérias nitrificantes em parceria com as bactérias anammox vem acrescentar novas possibilidades para o ciclo do nitrogênio e a aplicação deste no tratamento de águas residuárias. Estes dois grupos podem ainda ser parceiros naturais em ecossistemas, onde a ocorrência de oxigênio seja limitada. Sob estas condições, as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia são capazes de oxidar amônia a nitrito, o qual será consumido por bactérias anammox juntamente com o restante da amônia. Como os produtos desta cooperação, têm-se, principalmente, o gás nitrogênio, além de pequenas quantidades de nitrato. Não obstante, quando a amônia é o substrato limitante, a afinidade dos dois grupos de bactérias oxidadoras de amônia por ela pode ser decisiva para o desfecho da competição entre eles. No entanto, ainda falta muito para se compreender a complexidade total da conversão de nitrogênio em detalhes. Para se aprofundar nos estudos acerca da coexistência de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia com as anammox o foco deverá ser na regulação do metabolismo nitrificante, nas interações com a comunidade, e na diversidade filogenética dos microrganismos responsáveis pela conversão de nitrogênio (SCHMIDT *et al.*, 2002).

3.5 Reator em Batelada Sequencial (RBS)

Muitos microrganismos não são conhecidos atualmente pelo fato de não serem cultiváveis por métodos convencionais ou por apresentarem crescimento muito lento, como é o caso das bactérias Anammox, cujo tempo de duplicação foi estimado inicialmente como sendo de 30 dias (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996). Atualmente acredita-se que o tempo de duplicação delas seja de aproximadamente 11 dias (JETTEN *et al.*, 2001a). A primeira tentativa bem-sucedida no enriquecimento parcial dos organismos que catalisam a reação anammox foi o uso do reator de leito fluidizado, o qual foi alimentado com meio mineral contendo somente amônio e nitrito, além de carbonato como única fonte de carbono (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996). A taxa de conversão da cultura enriquecida neste trabalho foi de 3 kg NH₄⁺/m³.d quando alimentados com 30 mM de NH₄⁺. Van de Graaf *et al.* (1996) afirmaram que

considerando a baixa taxa de crescimento desse grupo de bactérias (0.001 h^{-1}), não é surpreendente que um sistema com retenção de biomassa, como é o caso do reator de leito fluidizado, seja necessário para esse tipo de cultivo. Verificaram ainda que taxas de conversão razoáveis foram alcançadas somente quando quantidade suficiente de biomassa havia se acumulado no sistema.

Strous *et al.* (1998) observaram, no entanto, que o cultivo de bactérias anammox através do reator de leito fluidizado não foi satisfatório, porque a operação deste reator em escala laboratorial foi complicada. Muitas vezes, a retenção da biomassa neste reator não foi suficiente para manter a cultura de bactérias anammox. Devido ao longo tempo requerido para o cultivo dessas bactérias, que é superior a uma ano, várias tentativas de enriquecimento não foram bem sucedidas por problemas tais como dificuldades no controle do pH além da ocorrência de falhas das bombas responsáveis pela entrada do meio afluente e retirada do meio efluente (STROUS *et al.*, 1998). Em geral, a estrutura do biofilme (espessura e composição da população) não foi constante ao longo de todo o reator. Este último problema pode ser explicado pela falta de volume suficiente para proporcionar uma mistura completa no reator de leito fluidizado. Isso fez com que alguns locais do reator não recebessem substrato continuamente, conseqüentemente a biomassa nestas áreas foi exposta a escassez de alimento, o que levou a uma diminuição da atividade anammox. Todos esses problemas dificultaram a interpretação dos resultados quantitativos (STROUS *et al.*, 1998), uma vez que a estratificação, que é consequência da ausência ou redução do processo de mistura completa, pode ser comum em reatores de leito fluidizado (HEIJNEN, 1994 *apud* STROUS *et al.*, 1998).

Outra estratégia buscada para o cultivo de bactérias anammox foi a utilização de reatores em batelada. Alguns autores obtiveram sucesso na detecção de atividade anammox bem como no enriquecimento delas em reatores batelada (com trocas esporádicas do meio de cultura) (TSUSHIMA *et al.*, 2007, SANCHEZ-MELSIÓ *et al.*, 2009; TOH e ASHBOLT, 2002). Outros, entretanto, não obtiveram sucesso no enriquecimento mesmo após longos períodos de incubação. Lara (2009) incubou lodos provenientes de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) e de um sistema de lodos ativados, em meio autotrófico e anaeróbio em condições de batelada durante um período de 400 dias. O processo biológico verificado, nesta condição de incubação, foi a desnitrificação intensa, tanto para o lodo aeróbio quanto para o anaeróbio. A adição de cloranfenicol nos reatores não conseguiu inibir as bactérias desnitrificantes, que na condição de batelada foram favorecidas em detrimento

das bactérias anammox. Portanto, pelos trabalhos analisados verifica-se que nem sempre a estratégia de enriquecimento das anammox em batelada apresenta resultados satisfatórios.

Nesse contexto, diversas técnicas foram desenvolvidas para estudar microrganismos aderidos, sendo que todas elas se baseiam, geralmente, em duas estratégias, que são: A formação de biofilmes e a retenção de biomassa. Nesse sentido o Reator em Batelada Sequencial (RBS) constitui uma ferramenta importante para o enriquecimento dos organismos Anammox. Uma vez que, tal aparato conjuga essas duas características essenciais para o cultivo de microrganismos: proporciona a formação de biofilmes, os quais melhoram a culturabilidade dos microrganismos, e, simultaneamente, promove considerável retenção de biomassa.

Strous *et al.* (1998) utilizaram o Reator em Batelada Sequencial para o enriquecimento da comunidade microbiana de bactérias anammox demonstrando que o mesmo é um aparato experimental relevante para esse cultivo. Os autores destacaram os seguintes pontos fortes do RBS:

- Período de sedimentação curto, mas eficiente, garantindo retenção satisfatória de cerca de 90% da biomassa. Os autores sugeriram que as propriedades de sedimentação dos agregados podem ter sido aperfeiçoadas durante o enriquecimento, através da seleção de agregado com melhor sedimentação. Assim, o grau de enriquecimento relatado anteriormente, em um reator de leito fluidizado, havia sido de 64% (VAN DE GRAAF *et al.*, 1996), enquanto que o grau de enriquecimento nos agregados de biomassa do RBS foi 15% maior em relação a esse valor, alcançando o índice de 74%. Isto indica que a pressão seletiva no RBS foi ligeiramente superior àquela do reator de leito fluidizado, já que a duração do experimento foi o mesmo em ambos os casos (400 dias).
- Distribuição homogênea dos substratos, produtos e agregados de biomassa ao longo do reator, garantindo a obtenção de amostras representativas, além de evitar a ocorrência de estratificação do biofilme, assim a biomassa não foi exposta a escassez de alimento.
- Operação confiável por períodos superiores há um ano.
- Obtenção de condições estáveis de operação permitindo um balanço de massa definido sob baixas concentrações de substrato.

- Para a instalação e operação do RBS, em escala laboratorial, não foi necessária a instalação de nenhum equipamento especial, além do equipamento habitual utilizado para o cultivo contínuo, tornando esta técnica de cultivo acessível a muitos laboratórios de microbiologia.
- Os resultados obtidos com o RBS podem ser traduzidos diretamente para uma aplicação prática do processo anammox, uma vez que, a retenção eficiente de biomassa é um dos os principais fatores limitantes para a aplicação do processo em escala real, com o intuito de se remover nitrogênio amoniacal de águas residuárias. Não obstante, o aumento de escala deste equipamento seria relativamente fácil.

Portanto, Strous *et al.* (1998) demonstraram que a retenção eficiente de biomassa e a estabilidade operacional, obtidas por técnicas convenientes, tais como o RBS podem propiciar o enriquecimento e o estudo de microrganismos que estariam fora do alcance das técnicas microbiológicas clássicas de cultivo. Sendo assim, o uso do RBS no presente trabalho se justifica, uma vez que a utilização do mesmo mostrou-se eficiente para o enriquecimento e estudo quantitativo de microrganismos de crescimento lento, que é o caso das bactérias Anammox.

3.6 Trabalhos que fizeram o enriquecimento de bactérias 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 acceptor de elétrons, respectivamente. A concentração de oxigênio foi mantida abaixo dos níveis de detecção ($<1\mu\text{M}$) no intuito de se evitar efeitos inibitórios. Após enriquecimento da biomassa anammox, a velocidade de remoção de nitrogênio aumentou de $0,4 \text{ KgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no lodo original para $2,4 \text{ KgN.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. 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 $9 (\pm 5) \times 10^3$ células $(\text{mgSV})^{-1}$ de oxidadoras de amônia

e $1 (\pm 0,9) \times 10^3$ (mgSV)⁻¹ de oxidadoras de nitrito. Comparado a uma cultura pura de *Nitrosomonas europea* com 9×10^9 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 RBS com 5mM de NH₄⁺ e 5mM de NO₂⁻, após esse tempo as concentrações de amônio e de nitrito foram aumentadas gradualmente, chegando a 30mM. Esse trabalho é de extrema relevância, uma vez que os autores operaram os RBS por mais de 1 ano, realizando vários cálculos de balanço de massa (de carbono e nitrogênio) o que possibilitou o cálculo da estequiometria da reação anammox, bem como determinaram parâmetros de crescimento desta bactéria (tempo de duplicação de 11 dias entre outros). Além disso, como foi dito anteriormente, indicaram o RBS como sendo a melhor forma de se enriquecer bactérias de crescimento muito lento, como as anammox, devido aos aspectos enumerados no item 3.5.

Egli *et al.* (2001) enriqueceram anammox a partir de biofilme proveniente de reator com biodiscos tratando águas residuárias rica em amônia (em Kölliken, Suíça). Fizeram o cultivo em batelada (frascos de 2L), através da técnica de diluição e enriquecimento. Após seis meses de cultivo obtiveram, 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 20mM) e a nitrito (maior que 13mM), e estava ativa em baixa concentração celular. Não obstante, 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 RBS. 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 $\text{gSSV}\cdot\text{dm}^{-3}$, apresentando atividade anammox específica de $0,18\text{gNH}_4^+-\text{NgSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. O reator foi capaz de tratar cargas de nitrogênio de até $1,4\text{ kg Nm}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, atingindo 82% de eficiência de remoção. A modelagem da partida e da operação do reator anammox foi realizada utilizando o modelo para lodos ativados nr1, o qual é aplicado para processos em duas etapas (nitrificação e desnitrificação), sendo adaptado para anammox. As simulações foram condizentes com os dados experimentais em relação às concentrações dos compostos nitrogenados e puderam ser usadas para estimar a evolução da biomassa anammox e de heterotróficas no reator. Além disso, 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.

Kieling (2004) estudou a remoção biológica de nitrogênio em RBS inoculado com lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico, sob condições anóxicas, assim como acompanhou o desenvolvimento das populações microbianas. O lodo nitrificante, utilizado como inóculo, foi proveniente de um sistema de lodos ativados para tratamento de esgoto doméstico. Este lodo foi adaptado por 130 dias em meio autotrófico nitrificante (aeróbio) e posteriormente utilizado como inóculo em dois reatores RBS (RI e RII). O reator RI, após ser submetido a lavagem celular inicial, e o reator RII foram operados com retenção de células, sendo aplicado um TDH (tempo de detenção hidráulica) 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 $25\text{ mgN}\cdot(\text{gSST})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ a partir de 150 dias, muito superior ao RII ($5\text{mgN}\cdot(\text{gSST})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). 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.

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) se deveu à adição de hidrazina e hidroxilamina que são intermediários do processo. Os autores verificaram que a atividade máxima anammox foi $0,26 \text{ mmol NH}_4^+ (\text{g biomassa})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,58 \text{ Kg N-total m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$). Análises qualitativas através da técnica de FISH confirmaram que as bactérias enriquecidas eram anammox pertencentes à ordem *Planctomicetales*, e 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 (“*Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite*”) no 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 sequencial, respectivamente. O processo anammox não foi inibido pela intermitente e repetida exposição ao oxigênio, permitindo a remoção autotrófica completa do amônio ($0,08 \text{ KgN m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) por longo período de tempo.

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 biorreator operado sob fluxo contínuo e com células imobilizadas. Verificaram após 16 meses de operação que houve remoção de nitrogênio da ordem de $500 \text{ g de N.m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1}$ de resíduo (de suinocultura). O processo anammox e o sistema de fluxo contínuo com células imobilizadas se mostrou 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 1 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 (Demanda Bioquímica de Oxigênio), 98,5% de NTK (Nitrogênio Total Kjeldahl), 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.

Chamchoi & Nitorisavut (2007) utilizaram três reatores (RBS) para o enriquecimento de bactérias anammox a partir de lodos convencionais, incluindo lodo do reator anaeróbio com manta de lodo (UASB), lodo ativado e lodo de um digestor anaeróbio. Após quatro meses de operação, atividade anammox foi detectada em todos os reatores permitindo a remoção contínua de amônia e nitrito. A morfologia da biomassa cultivada foi observada utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As imagens indicaram que a cultura obtida apresentava, principalmente, células de forma esférica, sugerindo ser esta biomassa constituída por células anammox. Além disso, foram detectadas também bactérias filamentosas coexistindo no sistema. As análises de FISH, utilizando sondas PLA46 e Amx820, revelaram que a população dominante desenvolvida em todos os três reatores hibridou com ambas as sondas, indicando que a biomassa cultivada em todos os reatores eram bactérias do grupo Planctomicetos, que abrange as anammox, tais como *Candidatus Brocadia anammoxidans* e *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*. A análise do desempenho dos reatores, revelou remoção quase que total de nitrito, com base em concentrações afluentes de 50 a 70 mg/L de N-NO₂. A eficiência máxima de remoção de amônia foi de 80% para concentrações afluentes de 40 a 60 mg/L de N-NH₄⁺. Os autores concluíram, portanto, que o cultivo de bactérias anammox, a partir de lodos convencionais, foi fortemente possível sob um ambiente com condições controladas, em um período de quatro meses.

O enriquecimento das bactérias anammox também foi realizado a partir de amostras ambientais. Nakajima *et al.* (2008) realizaram um enriquecimento de anammox marinhas (MAB), utilizando um reator em coluna preenchido internamente com uma malha de tecido sintético, a qual havia sido colocada previamente no fundo do mar e mantida por 3 meses, no intuito de acelerar o processo de enriquecimento. Este reator foi continuamente alimentado com NH₄Cl e NaNO₂ por mais de um ano. A atividade anammox no reator foi confirmada pela análise de ¹⁵N marcado (usando ¹⁵NH₄Cl e Na¹⁴NO₂). Os autores identificaram duas

sequências de DNAr 16S a partir da biomassa enriquecida, as quais foram altamente similares com aquelas de *Candidatus Scalindua wagneri* e com uma espécie de Planctomiceto ainda não identificada. A análise de FISH utilizando sonda específica para anammox (Amx820) também confirmou o predomínio de bactérias anammox marinhas no reator. Os autores afirmaram que esse foi o primeiro trabalho que fez o enriquecimento de bactérias anammox do ambiente marinho através de um sistema de cultivo contínuo. Além disso, eles sugeriram que sistemas contendo bactérias anammox marinhas podem ser aplicados, no futuro, com o objetivo de restauração e conservação do ambiente marinho.

Date *et al.* (2009) realizaram o enriquecimento de anammox utilizando também três tipos de lodos diferentes como inóculos, sendo eles: (i) lodo proveniente de uma estação de tratamento de esgoto, (ii) lodo coletado em um tanque de digestão e armazenado por dois meses em temperatura ambiente, e (iii) lodo nitrificante coletado a partir de um tanque de nitrificação tratando águas residuárias de uma criação de suínos. O enriquecimento a partir destes inóculos foi realizado em três reatores distintos, utilizando uma malha de tecido sintético com o intuito de imobilizar as bactérias anammox. Em todos os reatores a diversidade microbiana da biomassa anammox enriquecida foi investigada. Cerca de quatro meses após o início do enriquecimento, foi observada, nos três reatores, remoção simultânea de amônia e nitrito, além da produção de pequena quantidade de nitrato, que é exclusivo para a reação anammox.

Os resultados da análise filogenética baseada no gene RNAr 16S indicaram que diversas bactérias anammox foram cultivadas a partir de cada tipo de lodo utilizado como inóculo. Sendo que, a diversidade microbiana das anammox foi maior na cultura enriquecida a partir do lodo proveniente de uma estação de tratamento de esgoto, em relação aos outros dois tipos de inóculos usados. Além disso, no reator inoculado com o lodo de esgoto, houve coexistência de *Bacillus sp.* com a cultura anammox cultivada. Os autores sugeriram que a presença de *Bacillus sp.* pode resultar na criação de um ambiente ideal para as bactérias anammox, uma vez que, como *Bacillus sp.* são aeróbios ou anaeróbios facultativos, eles podem remover o oxigênio dissolvido e o carbono orgânico. Estes resultados indicaram que as diferenças da comunidade anammox na cultura enriquecida, em cada um dos reatores, estavam diretamente relacionadas ao tipo de lodo utilizado como inóculo (DATE *et al.*, 2009).

Por fim, Banihani *et al.* (2010) investigaram o enriquecimento das anammox a partir de cinco tipos de inóculos, sendo três deles coletados em estações de tratamento de águas residuárias

municipais, obtidos a partir de unidades operacionais diferentes tais como: Lodo de retorno do sistema de Lodos Ativados, lodo digerido anaerobiamente e lodo coletado na vala de oxidação. Além disso, dois lodos granulares metanogênicos também foram investigados: Lodo granular, obtido a partir de um reator UASB tratando águas residuárias de uma destilaria e o lodo granular obtido em um reator UASB tratando efluentes de cervejaria. O objetivo deste estudo foi examinar qual dos lodos provenientes de diferentes fontes apresentaria o maior nível de atividade anammox. Os inóculos foram enriquecidos em frascos de 250 mL funcionando como reatores em batelada, na ausência de luz, sendo amônia e nitrito monitorados periodicamente.

Os resultados indicaram que as culturas de bactérias anammox foram desenvolvidas a partir de lodos de estações de tratamento de águas residuárias, em um curto período de tempo (50 dias) em comparação ao que foi relatado na literatura anteriormente, o que foi comprovado pela detecção das anammox pela PCR. Além disso, o inóculo do lodo de retorno apresentou maior nível intrínseco de atividade anammox. Já os reatores inoculados com lodo granular provenientes de reatores UASB não apresentaram atividade anammox. Os autores sugeriram que a estratégia para o desenvolvimento da cultura de anammox em reatores batelada está relacionada ao fato de se manter concentrações não tóxicas de ácido nítrico e amônia, assim como boas condições de pH (BANIHANI *et al.*, 2010).

3.7 Ecologia microbiana das bactérias anammox

Os estudos a respeito da ecologia microbiana das bactérias anammox vêm sendo realizados com o intuito de se aprofundar os conhecimentos acerca do nicho ecológico e das formas de adaptação dessas bactérias aos ambientes naturais e antrópicos. Nesse contexto, tem sido investigada a diversidade metabólica das bactérias anammox, o fator (ou fatores) que determinam que apenas uma espécie de anammox seja enriquecida em um sistema, a sucessão de espécies anammox em um mesmo reator, além das raras ocorrências em que, em um mesmo sistema, duas espécies diferentes de bactérias anammox foram enriquecidas simultaneamente. Nesse último caso, tem-se pesquisado também se uma espécie é predominante em relação à outra, e o que pode governar essa prevalência. Já foram encontradas possíveis explicações para essas questões, mas ainda não há conclusões definitivas a respeito de quais fatores determinam essa diversidade de anammox em um mesmo sistema, e se existiriam diferentes micro-nichos dentro de um mesmo lodo que poderia explicar tal diversidade.

Kartal *et al.* (2007) descreveram uma nova espécie de bactéria anammox, com um nicho bem definido: a co-oxidação de propionato além do nitrogênio amoniacal. Essa nova espécie anammox foi enriquecida em um biorreator em escala de laboratório, na presença de amônio e propionato. Ela foi denominada *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*, e é capaz de competir com outras bactérias anammox, além de bactérias desnitrificantes heterotróficas para oxidar o propionato na presença de amônia, nitrito e nitrato.

Em outro trabalho, Kartal *et al.* (2008) investigaram o enriquecimento de bactérias anammox na presença de acetato. Os resultados reforçaram a idéia de que os organismos anammox podem ser enriquecidos, atingindo altas densidades populacionais, na presença de substratos para o crescimento heterotrófico. Os resultados apontaram para a descoberta de outra nova espécie anammox, denominada *Candidatus Brocadia fulgida*. Os experimentos mostraram que dentre as biomassas testadas, a biomassa que continha essa nova espécie oxidou acetato em uma taxa muito elevada. O cultivo contínuo demonstrou, que em presença de acetato, amônia, nitrito e nitrato, *Ca. Brocadia fulgida* foi bem sucedida na competição com outras espécies anammox (KARTAL *et al.*, 2008). Foi constatado ainda, que essa bactéria não incorporou o acetato diretamente em sua biomassa. *Ca. Brocadia fulgida* apresenta todas as características comuns às bactérias anammox (como presença de anammoxosomo e lipídios laderanos, além da produção de hidrazina, na presença de hidroxilamina). Entretanto, é peculiar desta espécie a intensa autofluorescência, quando esta se encontra formando agregados. É a única espécie anammox a apresentar essa característica (KARTAL *et al.*, 2008).

Van der Star *et al.* (2008) enriqueceram bactérias anammox em um biorreator de membrana (BRM), utilizando como inóculo um lodo granular anammox e observaram alteração da população ao longo do tempo de operação do reator. O lodo passou de granular para floculento por volta dos 60 a 65 dias de operação, porém com a redução dos níveis de cálcio e magnésio, e, possivelmente, a adição de extrato de levedura ao meio de cultura, além de uma baixa tensão de cisalhamento. Nestas condições obteve-se uma cultura em completa suspensão, constituída por células anammox livres. O crescimento rápido das bactérias anammox foi conseguido com um tempo de retenção de sólidos (TRS) de 12 dias. Este TRS relativamente curto resultou no alcance de uma pureza da cultura de bactérias anammox sem precedentes, atingindo 97,6% de predominância de anammox na biomassa enriquecida. Não obstante, o fato mais interessante desse cultivo, foi a mudança da população anammox

observada. A população inicial era de *Candidatus Brocadia*, mantendo-se assim até cerca de 35 dias de operação do reator. Em seguida, por volta dos 64 dias de operação, a população passou a ser constituída por uma mistura de *Candidatus Brocadia* e *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*. A partir dos 149 dias de operação a população do reator tornou-se majoritariamente formada por *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*.

Os referidos autores explicaram que a provável razão para esta mudança populacional deve ter sido a maior afinidade pelo nitrito por parte de *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*, uma vez que o nível de nitrito no reator variou consideravelmente, mas permaneceu, entre 2 e 6 μM . Como o reator foi operado a uma taxa máxima de conversão específica de 70 a 90%, a constante de meia saturação (K_S) para o nitrito deve ter se mantido em torno de 10 a 50% desse intervalo. Portanto, estimou-se que a concentração de nitrito no reator foi de 0,2 e 3 μM . Esta baixa concentração de nitrito é outra indicação de que as bactérias estavam realmente presentes como células livres, uma vez que qualquer aglomeração significativa acarretaria uma menor afinidade pelo substrato, devido à limitação de difusão do mesmo, ou seja, ocasionaria um maior K_S . Sendo assim, o K_S de bactérias anammox para nitrito foi estimado por Van der Star *et al.* (2008) como sendo de 0,2 a 3 μM para *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* e o K_S para *Ca. Brocadia* havia sido estimado como maior que 5 μM por Strous *et al.* (1999b). Em condições limitantes de nitrito, como foi o caso deste cultivo, ocorreu uma prevalência de *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* sobre *Ca. Brocadia*, uma vez que a primeira espécie apresenta maior afinidade por um substrato que estava pouco disponível.

Em enriquecimentos em escala de bancada, utilizando amônia e nitrito, geralmente células de *Ca. Brocadia* ou *Ca. Kuenenia* se tornam dominantes. Esse fato é um indicativo de que existe uma diferença clara entre o nicho de *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia* em relação a outros gêneros, como *Ca. Scalindua* (detectado em condições marinhas) ou *Ca. Anammoxoglobus* (enriquecido com propionato) (VAN DER STAR *et al.*, 2008). A diferenciação de nicho entre *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia* permanece, no entanto, sem ser solucionada. Tem sido sugerido que as células de *Ca. Brocadia* são mais suscetíveis à inibição por nitrito, e, portanto, não são enriquecidos em sistemas contendo altos níveis de nitrito (GAUL *et al.*, 2005).

Não obstante, a descoberta de vários enriquecimentos de *Ca. Brocadia* em reatores de grande escala, que são operados com níveis mais altos de nitrito (VAN DER STAR *et al.*, 2007),

refuta essa hipótese. Outro fator relevante, que é a aeração, também não parece desempenhar papel determinante, uma vez que nenhuma diferença clara foi encontrada entre a população de reatores onde há aeração, para nitrificação parcial, e reatores não aerados.

No biorreator de membrana, Van der Star *et al.* (2008) verificaram a prevalência de *Ca. Kuenenia* sobre *Ca. Brocadia* no cultivo quando o TRS foi de 16 dias. A taxa de crescimento específico mínimo foi de $0,0026 \text{ h}^{-1}$, que era o valor necessário para cultivo neste TRS, sendo que, este valor está em torno ou abaixo do valor da taxa máxima específica de crescimento tanto para *Ca. Kuenenia* quanto para *Ca. Brocadia*. Por isso, provavelmente a prevalência de *Ca. Kuenenia* não ocorreu com base na taxa de crescimento (VAN DER STAR *et al.*, 2008). A hipótese mais aceita, nesse caso, é de que a seleção positiva de *Ca. Kuenenia*, neste reator, se baseou na sua afinidade para com o substrato limitante, neste caso o nitrito.

Em outros enriquecimentos em escala de bancada (sem adição extra de ácidos, ou sais) utilizando o RBS a cultura, geralmente, tem predominância de *Ca. Kuenenia*, também nestes casos, a afinidade pelo nitrito pode ser o fator determinante (VAN DER STAR *et al.*, 2008). Com base nessas observações, Van der Star *et al.* (2008) sugeriram a hipótese de que *Ca. Kuenenia*, deve ser um microrganismo “k” estrategista, baseada na afinidade pelo substrato limitante, enquanto que *Ca. Brocadia* deve ser “r” estrategista, baseando-se na taxa de crescimento. Entretanto, os autores afirmaram que as afinidades pelo substrato limitante entre os dois grupos ainda não foram avaliadas com precisão suficiente para comprovar esta hipótese, portanto, são necessários ainda mais estudos.

Park *et al.* (2010) também observaram alteração na composição da população de bactérias anammox. Neste trabalho um RBS, com volume de 20 litros, foi inoculado com lodo granular anammox obtido de um reator anammox operado em escala de bancada, o qual por sua vez recebeu inóculo de um sistema que operava em escala real em Strass, Áustria. Além disso, outro reator, com volume de quatro litros, foi inoculado com lodo proveniente de um sistema de Lodos Ativados da cidade de Nova York, Estados Unidos, e operado como reator CANON. Os autores observaram que o RBS apresentou uma sucessão populacional ao longo do tempo de operação.

No inóculo original de Strass a população principal de bactérias anammox era constituída por *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*. Já durante o pré – enriquecimento a população passou a ser constituída por *Ca. Brocadia fulgida* (antes da operação do RBS). Por fim, durante a

operação, a população foi substituída novamente, passando a ser constituída por membros relacionados à *Ca. Brocadia* sp. 40. Por sua vez, o reator CANON, inoculado com Lodo Ativado, foi caracterizado no início do experimento, por uma baixa concentração de bactérias anammox, que não puderam ter a espécie identificada. No entanto, a operação do reator por mais tempo, permitiu o enriquecimento de população anammox que se mostrou proximamente relacionada com *Ca. Brocadia* sp. 40. Não obstante, dado que os dois reatores foram inoculados com culturas completamente diferentes, é notável que a comunidade global de ambos tenha sido semelhante (PARK *et al.*, 2010). Esses resultados contrastam com aqueles obtidos por Date *et al.* (2009), onde diferentes inóculos resultaram em distintas populações de bactérias anammox cultivadas em reatores operados de forma semelhante. Sendo assim, Park *et al.* (2010) sugeriram que a composição do inóculo e as concentrações de substrato existentes nos reatores podem desempenhar um papel importante na seleção da população bacteriana que irá se desenvolver, porém essa seleção não é equivalente para todos os grupos de bactérias anammox no ambiente complexo dos reatores.

Hu *et al.* (2010) determinaram a diversidade e a abundância de bactérias anammox em oito sistemas que removiam nitrogênio amoniacal, e que foram inoculados com lodos de fontes diversas (lodo anaeróbio digerido, lodo de um desses oito reatores, lodo nitrificante e mistura dos três tipos de lodo). O enriquecimento ocorreu utilizando quatro tipos diferentes de reatores, que trabalharam com condições operacionais diversificadas. Após longo período de enriquecimento (12 a 30 meses), utilizando amônia e nitrito, bactérias anammox foram detectadas como os microrganismos dominantes em todos os reatores, segundo as análises de FISH. Segundo os autores os resultados das análises por PCR quantitativo foram semelhantes àqueles obtidos pela técnica de FISH, confirmando que as bactérias anammox foram os microrganismos dominantes nos reatores.

A abundância das anammox em sete dos oito reatores foi da ordem de 10^9 células/ml. No entanto, no reator 1 o número de cópias foi cerca de duas ordens de grandeza menor (10^7 células/ml), provavelmente devido ao fato desse reator ter sido alimentado com esgoto rico em matéria orgânica (glutamato de sódio). Entretanto, as bactérias anammox neste reator 1 apresentaram a maior taxa de remoção de nitrogênio por célula (42 pg/célula/dia). Dessa forma Hu *et al.* (2010) sugeriram, que mesmo na presença de glutamato, a atividade das bactérias anammox não foi afetada negativamente. Tal ocorrência pode indicar, que até certo ponto, essas bactérias poderiam concorrer pelo nitrito com bactérias desnitrificantes

heterotróficas mesmo na presença de um composto orgânico facilmente degradável (HU *et al.*, 2010).

Os autores afirmaram que, surpreendentemente, as cargas de nitrogênio, as composições dos meios de cultura, os tipos de reatores e o tipo de inóculo não apresentaram consequências claras com a identidade das espécies anammox dominantes em cada reator. A explicação mais provável foi que os inóculos deveriam conter várias (e distintas) espécies de anammox, o que poderia aumentar a adaptabilidade dos inóculos à novos parâmetros operacionais (HU *et al.*, 2010). Em relação a diversidade das bactérias anammox, verificou-se nos oito sistemas que um único filotipo de anammox foi dominante em cada um dos reatores. Além disso, em seis reatores pelo menos um, dos 20 fragmentos seqüenciados do gene RNAr 16S, poderia ser atribuído a um segundo grupo de bactérias anammox, sugerindo que poderiam haver micro-nichos nos biofilmes anammox, ou, que os grânulos podem, eventualmente, incentivar o crescimento de uma população anammox secundária, ainda que em pequenas concentrações (abaixo do limite de detecção da técnica de FISH , 10^3 a 10^4 células/mL).

Além disso, seis seqüências foram associadas ao gênero *Ca. Brocadia*, sendo que um desses clusters parecia constituir uma nova espécie do gênero *Ca. Brocadia*. Os autores classificaram provisoriamente esta nova espécie anammox de *Candidatus Brocadia sinica* (HU *et al.*, 2010). Não obstante, os autores afirmaram ainda que nos oito reatores anammox, apresentando diferentes condições operacionais, houve apenas indícios circunstanciais da razão que levou a uma espécie anammox ser dominante e não outra. Hu *et al.* (2010) concluíram que todos os lodos utilizados como inóculos para os oito reatores continham mais de uma espécie anammox e que uma ou mais espécies anammox podem se adaptar a um novo conjunto de fatores ambientais facilitando a partida de um reator anammox em escala real.

A partir do que foi exposto é notório a relevância de se aprofundar em estudos acerca da ecologia das bactérias anammox em ambientes naturais e antrópicos. Uma vez que, os conhecimentos acerca do assunto ainda são incipientes para que sejam formuladas explicações para as particularidades que envolvem o enriquecimento e o nicho ecológico das oxidadoras anaeróbias de amônia. Portanto, mais relatos de sucessão da população de bactérias anammox são necessários, além de estudos onde sejam operados reatores em duplicata (VAN DER STAR *et al.*, 2008) , bem como a determinação do K_S e μ_m e a avaliação do uso de outros

substratos orgânicos, além de propionato e acetato, no enriquecimento dessas bactérias são necessários para elucidar diversas questões a respeito da ecologia microbiana das anammox.

3.8 Métodos moleculares para detecção e quantificação de microrganismos

Técnicas moleculares são poderosas ferramentas para o monitoramento ambiental e para caracterização da diversidade microbiana podendo efetivamente avaliar mudanças no ecossistema e melhorar a compreensão das comunidades microbianas envolvidas em processos vitais dentro de um ecossistema. A biologia molecular é assim, uma estratégia bastante promissora e aplicável para a investigação das bactérias Anammox, uma vez que, a maioria dessas bactérias ainda não foi isolada, portanto, as técnicas como a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são essenciais para o futuro das pesquisas com as mesmas (SCHMID *et al.*, 2005).

3.8.1 Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A maioria das ferramentas moleculares utilizadas atualmente para estudos ambientais e análise de comunidades microbianas baseia-se na técnica da PCR, que consiste na amplificação de uma parte do DNA que seja de interesse para o estudo (como, por exemplo, o gene que codifica o RNAr 16S) (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS & FALLONA, 1987). A PCR é uma técnica que visa à identificação de uma série de microrganismos, pertencentes aos vários grupos, em diversas amostras. Tudo isso possibilita a descoberta de microrganismos não cultiváveis bem como a utilização de seus genes, muitos deles inexplorados e com propriedade de interesse, fazendo desta tecnologia um importante recurso para o estudo da ecologia microbiana nos mais diferentes ecossistemas (CULLEN *et al* 2001; HEUSER & ZIMMER, 2002).

A capacidade de se poder extrair o DNA de células contidas em amostras diversas, como as de solo, água, sedimento e lodo, e o uso deste aplicando a PCR e suas variações permite verificar a presença de microrganismos, em pequeno ou grande número, não detectáveis por outros métodos (PILLAI *et al.*, 1991). A aplicação desta tecnologia para o estudo de comunidades *in situ* supera as limitações inerentes a outras técnicas utilizadas em estudos

ambientais e de reatores, tais como o isolamento e cultivo tradicional e. A PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de DNA a partir de uma sequência alvo. Para a realização da PCR é preciso o conhecimento prévio da sequência alvo. A especificidade da técnica é obtida a partir de oligonucleotídeos que funcionam como iniciadores da síntese e são complementares ao gene ou à região do ácido nucléico de interesse (MULLIS & FALONA, 1987). A PCR vem sendo usada para clonagem de genes ou segmentos de genes da mesma espécie, ou de espécies distintas, bem como no diagnóstico de doenças, e na detecção de microrganismos como bactérias, fungos e vírus.

O método inicia-se com a extração do DNA da comunidade de microrganismos presentes em uma amostra, seguido da amplificação *in vitro* dos fragmentos de tamanhos similares e diferentes composições de nucleotídeos. Neste processo, o fragmento de DNA de interesse é replicado várias vezes através da enzima DNA polimerase que, por sua vez, copia o DNA. Para que isso ocorra, a DNA polimerase necessita de uma fita molde e de um iniciador específico ao microrganismo que se quer investigar. O iniciador nada mais é do que um segmento de DNA cujas bases nitrogenadas (adenina, citosina, timina, guanina) pareiam com as da fita molde, funcionando como um “iniciador” para as cópias de DNA a serem formadas, uma vez que ele se hibrida com a fita molde. A PCR baseia-se em ciclos de reação em três etapas que são a desnaturação do DNA, o anelamento dos iniciadores e a extensão da fita. A amplificação ocorre durante repetidos ciclos de alteração de temperatura que variam de baixa a elevada em cada uma das etapas, a saber: 94°C para desnaturação do DNA, 45°C a 70°C para hibridização dos oligonucleotídeos às seqüências-alvo e 72°C para a síntese do DNA, em equipamentos denominados termocicladores. O DNA amplificado pode, então, ser separado e visualizado em géis de agarose e utilizado para diversos fins (MOLINA & TOBO, 2004).

Devido à rapidez, especificidade e baixo custo, a técnica da PCR é uma das ferramentas moleculares mais utilizadas na investigação de microrganismos em amostras ambientais. Porém, como qualquer outra técnica, pode apresentar alguns problemas, como a inibição da amplificação do fragmento de DNA de interesse ou a amplificação de fragmentos incorretos, entre outros. Existe ainda um limite de detecção da técnica da PCR que permite inferir que um microrganismo, às vezes, não está ausente na amostra analisada e sim, abaixo do limite de detecção do método, o que torna conveniente conhecer este limite (GODINHO, 2010).

Embora a reação da PCR seja capaz de amplificar a sequência de DNA alvo a partir de um único microrganismo, um volume extremamente pequeno (1µl) de amostra de DNA utilizado na reação restringe o limite de detecção da PCR em, aproximadamente, 10^2 ou 10^3 células/mL, apesar da alta sensibilidade da PCR. Com isso, às vezes torna-se mais efetivo o próprio pesquisador verificar o limite de detecção dos microrganismos (e dos iniciadores testados) que se deseja estudar, a partir das culturas puras (HORÁKOVÁ *et al.*, 2008 *apud* GODINHO, 2010).

A técnica da PCR foi utilizada em diversos trabalhos envolvendo bactérias anammox. Strous *et al.* (1999b), com o objetivo de determinar a identidade filogenética das células anammox purificadas, extraíram DNA e RNA de suspensões purificadas e amplificaram o gene do RNAr 16S diretamente usando a Reação da PCR, utilizando iniciadores universais. Com isso, foi possível confirmar que o microrganismo era um membro do grupo Planctomicetos. Já Schmid *et al.* (2000) investigaram a estrutura da comunidade microbiana do biofilme de um filtro biológico com alta atividade anammox. Nesse estudo a caracterização filogenética dos microrganismos presentes no biofilme anaeróbio foi realizada através da PCR com iniciadores específicos para as anammox e planctomicetos.

Egli *et al.* (2001) analisaram uma cultura anammox enriquecida em um reator contendo biodiscos, tratando lixiviado rico em amônia e com baixo teor de carbono orgânico. Este enriquecimento levou a uma prevalência de 88% de bactérias anammox na população total de microrganismos. A identificação das anammox foi realizada por meio da PCR utilizando pares de iniciadores específicos para estas bactérias, tais como: o Pla46F (5'-ggattagcatgcaagtc-3') e Amx820R (5'-aaaaccctctacttagtgccc-3'). Esse par de iniciadores vem sendo largamente utilizado na literatura para detecção das anammox em trabalhos como o de Egli *et al.* (2003), Jetten *et al.* (2005), Byrne *et al.* (2009) entre outros. Li *et al.* (2010), por sua vez, testou alguns pares de iniciadores já utilizados em outros trabalhos, os quais apresentaram uma variação de especificidade na faixa de 12% a 77%. Os autores concluíram que o par de iniciadores Brod541F e Amx820R, para o gene RNAr 16S de bactérias anammox, forneceu a maior especificidade e eficiência para identificação desses microrganismos. Essa combinação de iniciadores resultou em até 98% de especificidade, e as sequências recuperadas do gene RNAr 16S de anammox foram 95% idênticas às sequências publicadas a partir de anammox do grupo *Candidatus Scalindua*.

3.8.2 Técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

O uso da técnica de hibridação *in situ* fluorescente, o FISH (*Fluorescent In-Situ Hybridisation*) consiste no mesmo princípio da “impressão digital”, uma vez que os organismos podem ser identificados dentre uma população mista, por apresentarem uma região complementar à sonda a ser utilizada (AMANN *et al.*, 1995). Trata-se de um método que permite quantificar, por microscopia de fluorescência, microrganismos presentes em diversos ambientes sem a necessidade de se fazer a extração do DNA. Devido à sua baixa taxa de modificação evolutiva, sua importância na síntese de proteínas, e pelo fato de estar presente em todos os organismos, as sequências que codificam para o RNA ribossômico, RNAr 16S (em procariotos), ou RNAr18S (no caso de eucariotos) têm sido usadas mais extensamente para classificar de forma filogenética a diversidade da vida (WOESE, 1987; WOESE *et al.*, 1990). A molécula do RNAr 16S (que faz parte da subunidade menor do ribossomo) apresenta 1.542 bases, sendo 568 posições conservadas e 974 posições variáveis (conforme Figura 3.3). Geralmente as sondas gerais, domínio específicas por exemplo, são complementares àquelas regiões conservadas do RNAr 16S, e as sondas específicas para diferentes grupos ou gêneros de bactérias são complementares àquelas regiões mais variáveis.

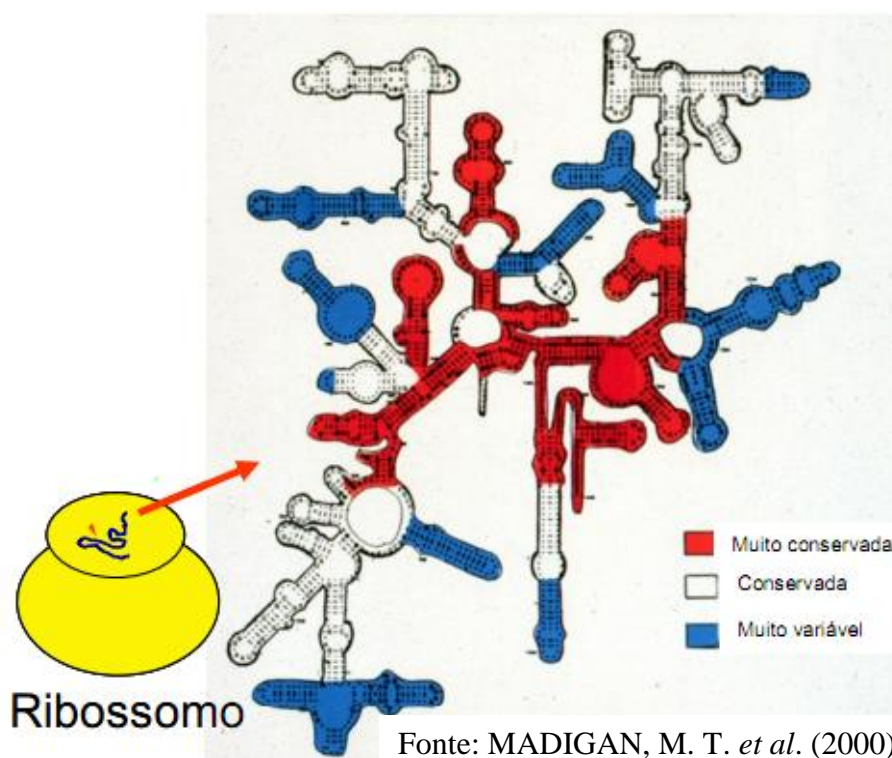


Figura 3.3 – Esquema da estrutura secundária da molécula de RNAr 16S

A técnica tem por base o uso de sondas (pequenas seqüências complementares ao RNAr 5S, 16S, 23S ou complementares ao RNAm) marcadas com compostos fluorescentes. 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. Dependendo das sondas empregadas, o FISH pode ser usado para detectar e quantificar microrganismos de diferentes níveis filogenéticos. Inúmeros autores têm utilizado técnicas de biologia molecular, dentre elas o FISH, para acompanhar o desenvolvimento de populações microbianas nos biorreatores estudados (ARAUJO *et al.*, 2000, 2004; EGLI *et al.*, 2001; JETTEN *et al.*, 2001a; MONTENEGRO *et al.*, 2003; GÜVEN *et al.*, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram realizados dois experimentos de enriquecimento e cultivo de biomassa anammox, em épocas distintas no mesmo reator em batelada sequencial (RBS) e usando o mesmo lodo de inóculo (lodo ativado). No primeiro experimento, denominado de **experimento I**, o RBS foi operado e monitorado por 420 dias (de maio de 2008 a julho de 2009). No segundo experimento, denominado **experimento II**, o RBS também foi operado por 420 dias (de outubro de 2009 a Novembro de 2010).

4.1 Lodo de inóculo para enriquecimento das bactérias anammox

A escolha do inóculo se baseou em trabalho prévio (ARAÚJO & CHERNICHARO, 2007), no qual bactérias anammox, provavelmente do gênero *Brocadia*, foram detectadas, através da PCR, em diferentes amostras: lodo anaeróbio proveniente de reator UASB tratando esgoto doméstico, amostras de lodos ativados proveniente da ETE ARRUDAS/COPASA, e, no lixiviado de aterro sanitário. Como inóculo para o enriquecimento das bactérias anammox em reator batelada sequencial optou-se então, pela utilização da amostra de lodos ativados.

Foram coletadas alíquotas de lodo da etapa de recirculação do decantador secundário do sistema de lodos ativados da ETE Arrudas COPASA (Figura 4.1) em dois períodos distintos para a inoculação do RBS em cada um dos dois experimentos (I e II). A primeira alíquota apresentava volume de um litro e foi coletada em abril de 2008 (inóculo do experimento I), já a segunda alíquota apresentava volume de dois litros e foi coletada em outubro de 2009 (inóculo do experimento II). Após as amostras chegarem ao laboratório, foram realizadas as análises de sólidos totais voláteis (STV), segundo método do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2005, para determinar a concentração de biomassa presente no lodo em gramas de $STV.L^{-1}$. Além disso, alíquotas das duas amostras foram preservadas para a realização de ensaios de biologia molecular, no intuito de se confirmar a presença de bactérias anammox nas mesmas.

Para a amostra coletada em outubro de 2009 também foi realizada a determinação do número mais provável (NMP) de bactérias nitrificantes (oxidadoras de amônia e de nitrito), através da técnica de tubos múltiplos segundo metodologia adaptada daquela descrita por Alexander & Clark (1982). Para essa mesma amostra determinou-se também o número mais provável (NMP) de bactérias desnitrificantes, segundo a metodologia descrita por Tiedje (1982).

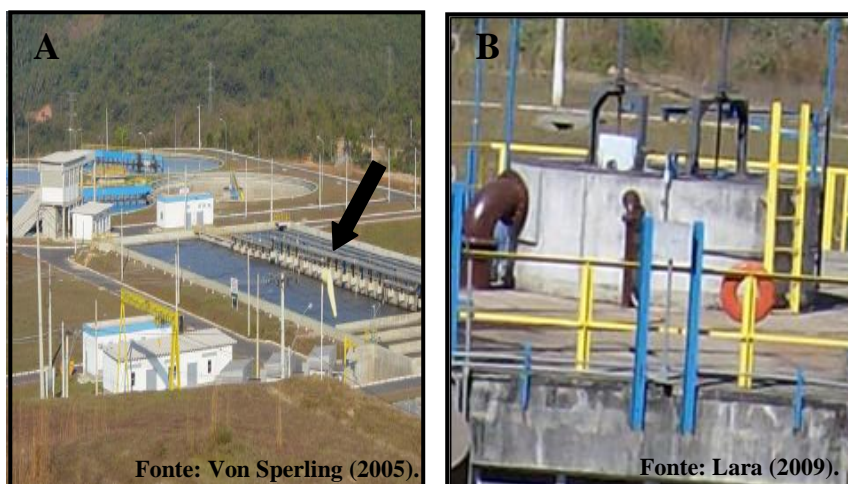


Figura 4.1 – (A) Foto geral do sistema de lodos ativados da ETE Arrudas COPASA e **(B)** Foto da etapa de recirculação do decantador secundário do sistema de lodos ativados da ETE Arrudas COPASA (vazão média de $1,86\text{m}^3/\text{s}$).

4.2 Meio de cultura usado no enriquecimento das bactérias Anammox

Para o cultivo e enriquecimento das anammox foi utilizado um meio mineral autotrófico, cuja composição foi a mesma descrita em Dapena-Mora *et al.* (2004) e Van de Graaf *et al.* (1996), e é apresentada na Tabela 4.1. O meio de cultura continha inicialmente 30mg/L de amônia e 30 mg/L de nitrito, mas estas concentrações foram gradativamente aumentadas (em cada um dos experimentos), conforme será apresentado no item Resultados e discussão. 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 $7,05\text{ mL}$ desta solução. Utilizou-se um medidor de pH de bancada, calibrado com soluções tampão $4,01$ e $7,01$ da Merck. Para o ajuste do pH da solução, foi utilizada solução HCl concentrado. 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 abaixo para obtenção das respectivas concentrações finais, conforme demonstrado na Tabela 4.1:

- $2,4\text{ mL}$ da solução $0,5\text{M}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (concentração final $0,18\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),

- 2,4 mL da solução 0,5M de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (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}) – Experimento I	Concentração (g.L^{-1}) – Experimento II
$(NH_4)_2SO_4$	0,141 - 0,376	0,160 - 0,445
$NaNO_2$	0,148 - 0,474	0,221 - 0,469
$KHCO_3$	0,5	0,5
KH_2PO_4	0,027	0,027
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,18	0,18
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3	0,3
Solução de micronutrientes I	1,0 mL	1,0 mL
Solução de micronutrientes II	1,25 mL	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
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	6,25	15,0
$FeSO_4$	6,25	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-	0,43
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	-	0,24
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	-	0,99
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	-	0,25
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	-	0,22
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	-	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 preparo das soluções seguiu o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (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. A concentração inicial de nitrito (usado como aceptor 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 experimento, como pode ser verificado na tabela 4.1.

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 UFC por mL.

4.3 Montagem e características do reator

O enriquecimento das bactérias anammox foi feito em reator de vidro com volume total de 1,3 L (Fermentador Bio-Flo 110 da New Brunswick), equipado com eletrodos de OD (Oxigênio Dissolvido), pH, temperatura e sensores de nível. Este fermentador foi operado sob a forma de reator em batelada sequencial (RBS) conforme Dapena-Mora *et al* (2004) e Third *et al* (2005) (Figura 4.2). A anaerobiose foi obtida por meio de fluxo de gás (mistura de Argônio (95%) e CO_2 (5%)) de forma intermitente no líquido do reator, bem como no *headspace* do frasco contendo o meio mineral autotrófico (afluente do reator).

Esse reator foi inoculado em dois momentos distintos (experimentos I e II). As características de cada um dos inóculos, bem como o tempo de operação, encontram-se descritas na Tabela 4.3. O volume de inóculo utilizado, em cada experimento, variou de 650 a 1500 mL, conforme apresentado na Tabela 4.3. Os lodos foram previamente centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos e misturados ao meio de cultura autotrófico e anaeróbico, antes de serem adicionados ao reator, 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%) havia sido fluxionado previamente no meio de cultura por cerca de dez minutos. Em seguida, o frasco foi fechado com rolha de butila esterilizada e tampa de rosca. O inóculo adicionado ao meio de cultura foi bombeado para o reator por meio do sistema de bombas

peristálticas presente no mesmo. Na atmosfera do reator foi injetado fluxo de gás (argônio 95% e dióxido de carbono 5%), por meio de uma mangueira acoplada ao mesmo. Desse modo, além de se manter a atmosfera do reator anaeróbia também foi fornecido dióxido de carbono (CO₂) dissolvido no meio, para permitir o crescimento das bactérias anammox, que são autotróficas. O reator, em ambos os experimentos foi operado sob agitação de 50 rpm, a temperatura foi mantida constante em 34 ± 0,5°C (através de manta aquecedora), na ausência de luz para não haver crescimento de algas.

Tabela 4.3 - Características do inóculo, tempo e modo de operação em cada experimento

	Experimento I	Experimento II
Tipo de inóculo	Lodo ativado	Lodo ativado
Volume de inóculo utilizado (mL)	650	1500
Concentração de STV no inóculo (g/L)	4,0	4,6
Massa de STV no inóculo (g)	2,6	6,9
Concentração inicial de amônia (mg/L)	30	30
Concentração inicial de nitrito (mg/L)	30	42
Tempo em que se iniciou o aumento das concentrações afluentes de amônia e nitrito (dia)	No 90°	No 170 °
Tempo de operação (dias)	420	420
Período de operação	Abril de 2008 a julho de 2009	Outubro de 2009 a novembro de 2010

4.4 Operação e monitoramento do reator

4.4.1 Operação do reator

Em ambos os experimentos (I e II), o fermentador foi operado sob a forma de reator em batelada seqüencial (RBS), que consistiu de dois ciclos, cada um contendo 3 fases. O primeiro ciclo tinha a duração de 7 horas e compreendeu: (i) fase de alimentação na qual o meio mineral autotrófico (500 mL) foi introduzido no reator (com agitação contínua) ao longo de 6 horas; (ii) fase de decantação (30 minutos), na qual a agitação do sistema foi desligada e permitiu-se a decantação da biomassa; e, (iii) fase de retirada do meio (foram retirados 500 mL) que durava 30 minutos. O segundo ciclo durava cerca de 17 horas, possuía as mesmas etapas do primeiro, com a diferença de que após as 6 horas de alimentação do reator, o meio de cultura continuava reagindo com a biomassa por cerca de 10 horas. Após esse tempo,

foram realizadas as etapas de decantação e retirada do meio de cultura. O reator foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas, volume útil de 1 L, e retenção total de biomassa. As figuras 4.2 e 4.3 apresentam, respectivamente, uma representação esquemática do RBS e, uma foto do fermentador utilizado para o enriquecimento de bactérias anammox no presente trabalho.

A temperatura e o pH foram monitoradas quatro vezes ao dia. O reator operou na temperatura de 34°C, e o pH foi mantido em 7,5 por meio da adição de soluções de NaOH e H₂SO₄ acopladas a bombas peristálticas. Para manter a anaerobiose do sistema, que era todo fechado, fluxionava-se a mistura de gás Argônio e CO₂ (95%/5%) 8 vezes ao dia no meio líquido do reator, sendo que cada aplicação durava cerca de 10 minutos, bem como na atmosfera do frasco de alimentação (afluente), contendo meio de cultura autotrófico.

Após 30 dias do início de operação do fermentador, adicionou-se diariamente 1,0 mL de hidrazina (100 mM) e 1,0 mL de hidroxilamina (100 mM) diretamente no reator, tanto no experimento I quanto no II, de modo que a concentração final em cada reator fosse de 0,1mM, na tentativa de estimular a atividade das bactérias 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 essas bactérias.

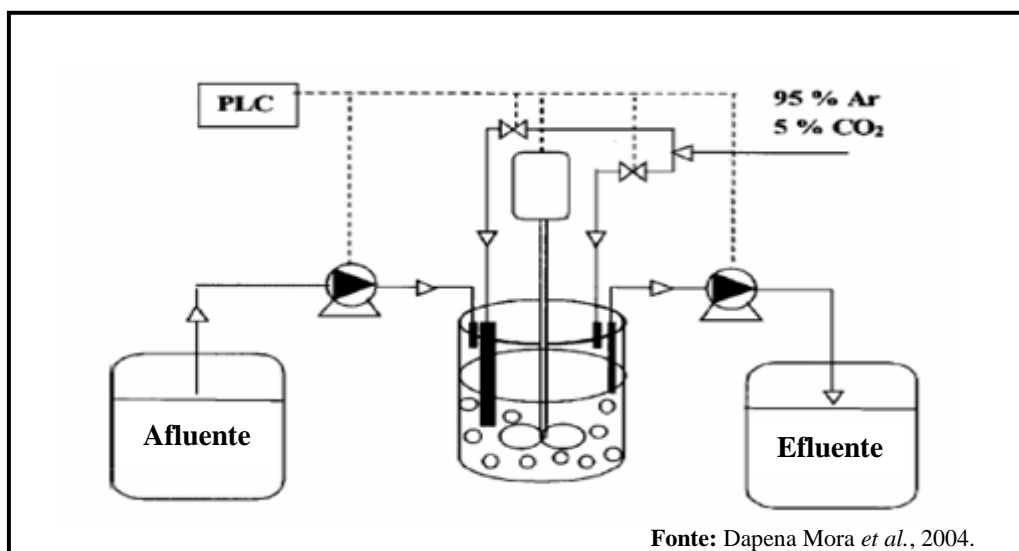


Figura 4.2 - Representação esquemática do Reator em Batelada Sequencial



Figura 4.3 – Foto do fermentador operado como Reator em Batelada Sequencial usado para o enriquecimento de bactérias anammox

4.4.2 Monitoramento analítico do reator

A retirada de amostra do meio líquido do reator, para caracterização físico-química, foi realizada de três a seis vezes por semana. Para isso, foram coletados cerca de 10 mL do meio efluente, após decantação total do lodo, garantindo a retirada somente do sobrenadante. O monitoramento analítico foi feito para determinação do pH, da concentração de amônia e nitrito, de modo a verificar se a amônia e o nitrito estavam sendo consumidos. A frequência e os parâmetros analisados para cada experimento 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 4.4 - Frequência das análises do reator

Experimento	pH	Nitrito	Amônia
I	6 vezes/S	3 vezes/S	3 vezes/S
II	6 vezes/S	3 vezes/S	3 vezes/S

S = semana

Os métodos analíticos utilizados nas análises físico-químicas durante os dois experimentos estão resumidos na tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Métodos analíticos utilizados

Análise	Método e Referência	Equipamento
Nitrito	Método colorimétrico do ácido sulfanílico 4500-B do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005)	Espectofotômetro DR2800 Hach
Amônia	Método do Fenato 4500 NH ₃ - F do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005)	Espectofotômetro DR2800 Hach
pH	Método 4500-H ⁺ - B do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005)	Medidor de pH de HANNA

4.5 Procedimentos das análises físico-químicas

4.5.1 Determinação de amônia

A análise de amônio foi conduzida segundo o Método colorimétrico 4500 NH₃ F - Método do Fenato segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (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 catalisado por nitroprussiato de sódio, segundo a reação química apresentada na figura 4.4:

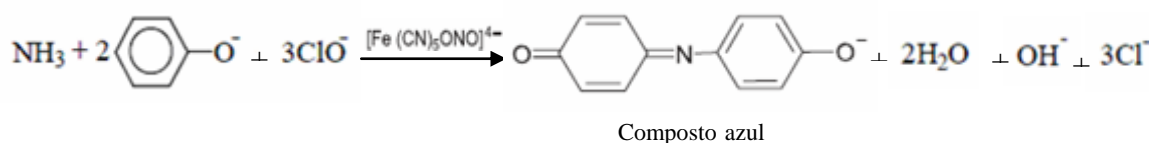


Figura 4.4 - Reação química da amônia com fenol para formar o indofenol na análise de amônia

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 ultra pura 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, se adicionou mais 200 µL da solução de nitroprussiato de sódio 0,5%, cuidando para agitar bem. Finalmente, foi adicionado 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 era o caso).

A curva de calibração foi 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.

$$Y = a.X + b \qquad \text{Eq. (4.1)}$$

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

4.5.2 Determinação de nitrito

A análise de nitrito foi realizada segundo o Método Colorimétrico 4500 NO₂ - B do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 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).

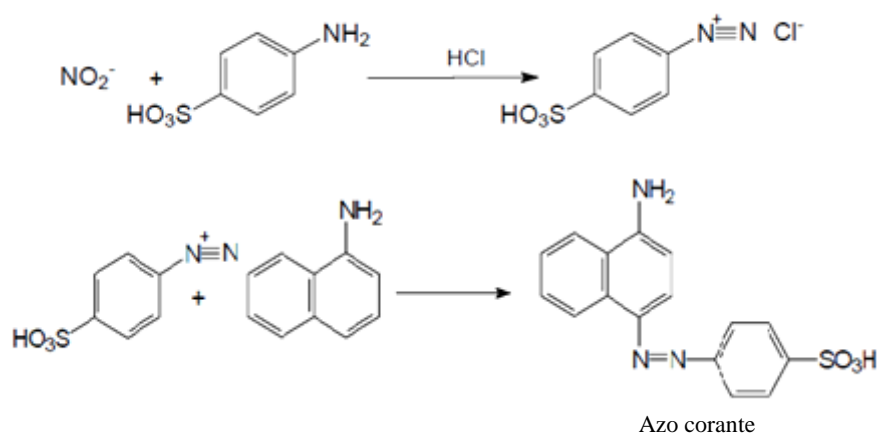


Figura 4.5 - Reação química do nitrito com ácido sulfanílico e acoplamento do N-naftil para formar o azo corante na análise de nitrito

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.

4.5.3 Determinação da concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (STV)

Sólido total é o resíduo sólido na cápsula de porcelana após secagem em forno à temperatura definida, segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (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 dos sólidos totais voláteis (STV) é feita submetendo a amostra à temperatura mais alta (550°C no caso), o que permite a volatilização e decomposição de matéria orgânica e inorgânica.

A técnica realizada nas amostras de lodo foi desenvolvida segundo o método 2540-G do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 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:

$$\% \text{ sólidos totais} = \frac{(A - D) \times 100}{A - B} \quad \text{Eq. 4.2}$$

Sendo: A = peso da cápsula com resíduo seco em estufa;

D = peso da cápsula com resíduo após queima em mufla;

B = peso da cápsula tarada em estufa

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.

4.5.4 Medição de pH

O princípio da medição eletrométrica de pH, segundo o método 4500-H⁺ B do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2005, é a determinação da atividade dos íons hidrogênio pela medição 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 presente trabalho 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 7,01 (MERCK). O eletrodo era inserido na amostra e o valor era obtido pela leitura direta na tela do equipamento.

4.6 Coleta de amostras para análise por técnicas de biologia molecular

Foram realizadas coletas de amostra de biomassa, tanto no experimento I quanto no experimento II, com o intuito de submeter essas amostras a análises por técnicas de biologia molecular (Hibridação *in situ* fluorescente e Reação em Cadeia da Polimerase- PCR). A análise dessas amostras tinha por objetivo investigar a composição da biomassa do inóculo e daquela enriquecida no Reator em Batelada Sequencial (RBS). O volume de amostra retirado do inóculo para posterior análise foi de cerca de 250 mL. O volume de amostra coletada do RBS foi sempre de aproximadamente 30 mL, contendo biomassa suspensa em meio de cultura. Os dois tipos de amostra foram sempre centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos após a coleta. O fluxograma da coleta seguiu as etapas apresentadas na figura 4.6.

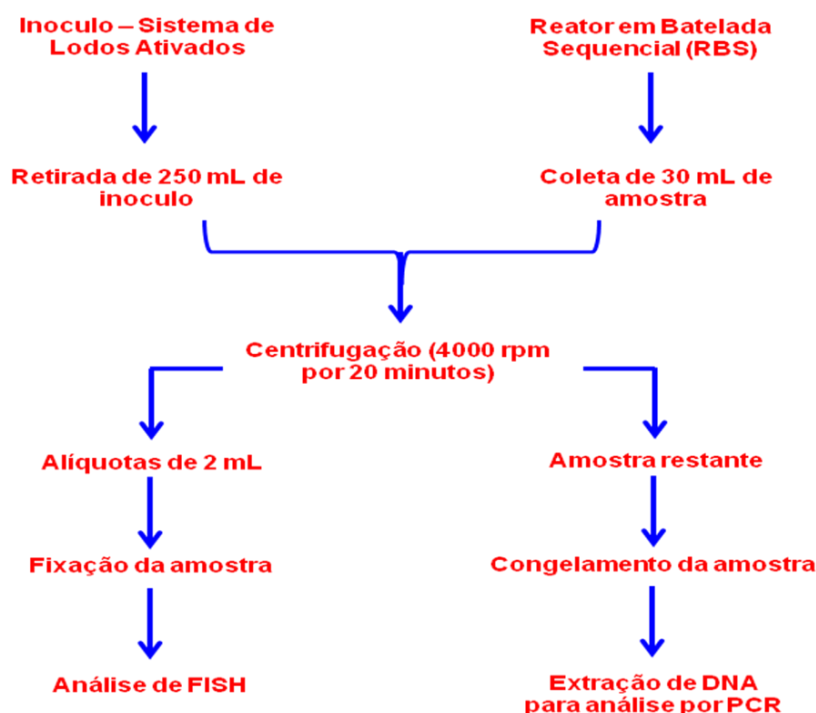


Figura 4.6 – Fluxograma de coleta de amostras para realização de análises de biologia molecular

A frequência de coleta de amostras em cada um dos experimentos é apresentada na tabela 4.6, sendo que o tempo de operação zero corresponde à amostra do inóculo. No primeiro

experimento houve um menor número de coletas, com maior intervalo entre elas, uma vez que, havia o receio de que a retirada excessiva de biomassa poderia ocasionar perturbações no sistema. Já no segundo experimento, as duas primeiras coletas tiveram intervalos grandes de tempo entre elas, visto que a biomassa estava se adaptando ao cultivo no Reator em Batelada Sequencial, já a partir do 160º dia de operação as 4 coletas seguintes tiveram intervalos de 21 dias. Não obstante, as duas últimas coletas apresentaram intervalos maiores, devido ao período de adaptação da biomassa ao aumento da concentração de nitrogênio amoniacal e nitrogênio nitroso do meio de cultura que alimentou o reator.

Tabela 4.6 - Frequência de coleta de amostras de biomassa no RBS

Experimento	Número de coletas	Tempo de operação (dias)
I	5	0
		181
		235
		331
		420
II	9	0
		80
		160
		181
		202
		223
		244
		270
		347

4.7 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Foram realizadas algumas análises microscópicas, utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) nos lodos utilizados como inóculo, bem como na biomassa desenvolvida no reator (em cada um dos experimentos), com o objetivo de verificar e tentar quantificar a presença de bactérias anammox e bactérias oxidadoras de amônia e nitrito. Os procedimentos seguiram os protocolos descritos por Amann (1995) e Egli *et al.* (2001).

A preparação da amostra para realização da técnica de FISH envolveu quatro etapas:

1. Fixação da amostra

2. Montagem da lâmina
3. Hibridação com a sonda específica
4. Coloração com DAPI e observação ao microscópio de fluorescência

A fixação da amostra consistiu, em fixar as células no estado que elas estavam. Durante a fixação, o paraformaldeído do tampão cria poros na membrana celular de forma a permitir a entrada da sonda na célula. A fixação mantém a morfologia da célula e permite que ela seja armazenada de forma a manter sua estrutura fisiológica intacta (no que diz respeito à concentração de RNAr sintetizado e presente no citoplasma da célula).

A etapa de montagem da lâmina envolveu a fixação das células na superfície vítrea da lâmina e a posterior desidratação das células já aderidas à lâmina. Após a fixação, iniciou-se o processo de hibridação propriamente dito. Este consistiu na incubação das células aderidas à lâmina com a sonda a ser utilizada em um meio que foi o tampão de hibridação. A hibridação foi feita em uma câmara úmida e escura, uma vez que a sonda é sensível à luz e pode perder sua fluorescência se exposta à luz por muito tempo. Ainda, a hibridação ocorreu em uma câmara climatizada com o tampão de hibridação, para que este não seque na superfície da lâmina impedindo a hibridação. A hibridação consiste, em termos moleculares, na entrada da sonda na célula e na ligação da mesma à uma porção do RNAr com sequência complementar a sua (formação do híbrido, ou hibridação de duas fitas). A temperatura e o tempo em que ocorreu a hibridação foi a 46 °C por 1 hora e 45 minutos), assim como a concentração de formamida utilizada no tampão. Após a hibridação a lâmina foi lavada para retirar sais presentes no tampão de hibridação.

Após a hibridação, as células foram coradas com DAPI (4,6-diamidino-2-phenilindol). Este é um corante para DNA, que se intercala no mesmo e, portanto, cora todas as células (não tem especificidade). Dessa forma, ao microscópio é possível observar somente os organismos alvo do ensaio quando se utiliza um filtro específico para a sonda (contagem das células hibridadas), ou pode-se observar todos os organismos da população microbiana da amostra utilizando filtro específico para o DAPI (contagem total das células). A figura 4.7 apresenta esquematicamente a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

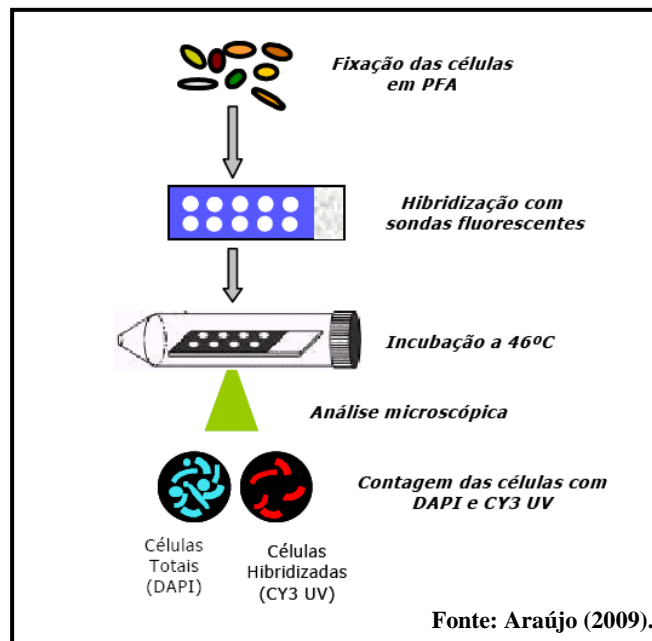


Figura 4.7 – Representação esquemática da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Cerca de 1,0 ml de lodo proveniente do sistema de lodos ativados, e 1,0 ml de amostra (meio líquido mais biomassa) do reator (proveniente dos dois experimentos), foram centrifugados a 8.500 rpm por três minutos. Posteriormente, essas amostras foram lavadas por duas vezes com 500 μ L de PBS (tampão fosfato salino - PBS 1X: 130 mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄, pH 7,2). O *pellet* resultante foi ressuscitado em 750 μ L de tampão de fixação (contendo paraformaldeído 4% em PBS) e 250 μ L de PBS 1X (diluído uma vez) e após homogeneização, a amostra foi incubada a 4°C (geladeira) por três horas no gelo. Após a fixação e lavagem com PBS 1X, esta amostra foi ressuscitada em 500 μ L de PBS 1X e 500 μ L 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 2,0 μ L das amostras fixadas foram aplicadas em cada pocinho da lâmina de vidro coberta com teflon. A amostra na lâmina passou por um processo de secagem em estufa a 46 °C por quarenta 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 8,7 μ L do tampão de hibridação (20mM Tris-HCl, pH 7,

5mM EDTA, 0,01%SDS, NaCl 5M, com porcentagem de formamida de acordo com a sonda) e 1,3 µL da sonda escolhida. As sondas de oligonucleotídeos que foram utilizadas encontram-se listadas na Tabela 4.7, e a porcentagem de formamida (no tampão de hibridação) e a concentração de NaCl (no tampão de lavagem) correspondentes a sonda utilizada são apresentadas na tabela 4.8. Com estas sondas foi possível identificar a maioria dos grupos filogenéticos de *Bacteria*, envolvidos nos processos de remoção de nitrogênio (nitrificação e oxidação anaeróbia de amônia). Estas sondas foram incluídas nesta pesquisa, uma vez que as bactérias anammox podem coexistir com as nitrificantes, que são oxidadoras aeróbias de amônia, tanto na natureza quanto em sistemas de tratamento (sob condições limitantes de oxigênio).

Após hibridação, a lâmina foi incubada em câmara úmida a 46°C por noventa minutos, seguindo as condições descritas em Egli *et al.* (2001). Após a hibridação foi feita a lavagem da lâmina a 48°C por vinte minutos, em tampão de lavagem. A composição deste tampão era semelhante ao tampão de hibridação, porém este não continha formamida e apresentou concentração de NaCl proporcional à porcentagem de formamida usada no 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, em ausência de luz. Após lavagem com água destilada, e secagem completa da lâmina, cerca de 6,0 µL da solução montante de 20% de PBS e 80% de glicerol foram aplicadas sobre cada pocinho e, posteriormente, colocou-se a lamínula. As lâminas foram visualizadas sob microscopia óptica em microscópio Olympus BX-50 em objetiva de imersão, para aumento de 1.000x, sob epifluorescência e contraste de fase. Foram utilizados filtros específicos com espectro de absorção entre 510 a 550 nm e de 330 a 385 nm para captação de emissões de fluorescência da sonda e do corante DAPI, respectivamente (ABREU, 2007).

Para a determinação da abundância de cada grupo microbiano analisado com a respectiva sonda, foram realizadas as contagens das células hibridadas (com cada sonda), bem como determinado o número total de células coradas com DAPI em 15 campos microscópicos distintos. Posteriormente calculou-se a proporção de células hibridadas em relação ao número total de células dividindo o primeiro valor pelo segundo.

Tabela 4.7 – Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na análise de FISH

Sonda	Grupo alvo	Sequência (5' → 3')	Referência
Amx-1240	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	5'-TTTAGCATCCCTTTGTACCAACC	Schmid <i>et al.</i> (2000)
Amx-820	Gêneros <i>Ca. Brocadia</i> e <i>Ca. Kuenenia</i>	5'AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	Schmid <i>et al.</i> (2000)
Nso190	A maioria oxidadoras de amônia da Subclasse β- <i>Proteobacteria</i> , incluindo <i>Nitrosomonas</i>	5'-CGATCCCCTGCTTTTCTCC	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Ntspa662	<i>Nitrospira</i>	5'GGAATTCGCGCTCCTCT	Daims <i>et al.</i> (2000)
NIT3	<i>Nitrobacter</i>	5'CCTGTGCTCCATGCTCCG	Wagner <i>et al.</i> (1996)

Tabela 4.8 – Condição de hibridação usada para cada sonda nas análises de FISH

Sonda	Porcentagem de Formamida	Concentração de NaCl	Referência
Amx-1240	40	56	Schmid <i>et al.</i> (2000)
Amx-820	25 ou 40	159 ou 56	Schmid <i>et al.</i> (2000)
Nso190	30	112	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Ntspa662	35	80	Daims <i>et al.</i> (2000)
NIT3	35	80	Wagner <i>et al.</i> (1996)

4.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.8.1 Coleta e preservação da amostra

Foram coletadas alíquotas de 50 mL da amostra do lodo ativado (utilizado como inóculo), e alíquotas de aproximadamente 25 mL da biomassa enriquecida no reator (em ambos experimentos). As amostras foram transferidas para frascos tipo *Falcon* e centrifugadas à 3.500 rpm (1.200 x g) por 10 minutos para remoção do líquido intersticial; descartando em seguida o sobrenadante. Em seguida as amostras foram lavadas duas vezes com 1 mL de Tampão fosfato de sódio salino (PBS) 1X, e centrifugadas novamente à 8.500 rpm por 3 minutos para remoção de partículas de sujeira. O sobrenadante foi descartado. As amostras foram então alíquotadas em tubos *Eppendorfs* de 2 mL, devidamente rotuladas, e armazenadas à -20°C para posterior extração de DNA.

4.8.2 Extração de DNA

Para as amostras de lodo, bem como para as amostras enriquecidas, neste trabalho, foi utilizado o protocolo de extração de DNA genômico descrito em Egli *et al.* (2001). Tal procedimento consiste nas etapas descritas a seguir.

Adicionou-se em um tubo de 2 mL com tampa de rosca 0,2 g de pérolas de vidro, 1 g de amostra congelada (de lodo ou da biomassa do RBS) e 1,2 mL de tampão TEN (0,1M NaCl, 10mM Tris-HCl, e 1mM de EDTA pH 8,0). Esse tubo foi levado a um microdesmembrador e agitado a 4.000 rpm por 1 minuto, sendo transferido para um banho de gelo e mantido por 1 minuto. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. A amostra sedimentou por 5 minutos à temperatura ambiente para separação das pérolas de vidro e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo *Eppendorf* de 2,0 mL. Foram adicionados o volume de Fenol tamponado (pH 8,0) igual ao volume da amostra e o tubo foi agitado vigorosamente utilizando um vórtex por 40 segundos. Adicionou-se ainda o volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) igual ao volume da amostra e agitou-se novamente no vórtex. A amostra foi centrifugada a 13.000 rpm (12.000 x g) por 10 minutos e transferiu-se o sobrenadante (fase aquosa) para um novo tubo tipo *Eppendorf* de 2 mL.

Novamente adicionou-se o volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) correspondente ao volume da amostra, agitando-o vigorosamente utilizando vórtex por 40 segundos, centrifugando-o à 13.000 rpm por 10 minutos. Essa etapa foi repetida quando a amostra ainda não se apresentava pura, ou seja, apresentava cor na fase líquida. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo *Eppendorf* de 2 mL, adicionando a ele 10% do volume da amostra de uma solução de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e o dobro do volume da amostra de etanol 100% (gelado). O tubo foi mantido à -20°C por 1 hora e meia para precipitação de DNA. A seguir a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm (12.000 x g) por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se ao tubo 300 µL de etanol 70% com o objetivo de lavar o DNA e retirar os sais. A amostra foi centrifugada a 13.000 rpm (12.000 x g) por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. O tubo foi então vertido sobre um papel toalha para e deixar o DNA secar por mais ou menos 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, o DNA foi ressuscitado em 100 µL de água ultra-pura estéril, previamente aquecida a 70°C. Alíquotas de 5,0 µL de cada amostra extraída foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% a 75 V por 40 minutos. O gel foi

corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta para verificação da quantidade e integridade do DNA genômico obtido na extração.

4.8.3 PCR com iniciadores específicos para as bactérias anammox

Com o objetivo de se detectar as bactérias anammox, o DNA extraído pelo método de Egli *et al.*, 2003, a partir das amostras de lodos ativados e da biomassa enriquecida no RBS (em ambos os experimentos), foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando pares de iniciadores específicos para o DNAr 16S de anammox e Planctomicetos de acordo com Schmid *et al.* (2000), Egli *et al.* (2001), Penton *et al.* (2006) e Van der Star *et al.* (2007).

Os pares de iniciadores utilizados, bem como a sequência e especificidade dos mesmos, encontram-se descritos na Tabela 4.9. A reação de amplificação foi realizada de acordo com os volumes e concentrações de cada reagente descritos na tabela 4.10.

Tabela 4.9 – Iniciadores utilizados para a detecção de bactérias anammox

Iniciador	Especificidade	Sequência (5' → 3')	Referência
Amx667r	Organismos Anammox	ACCAGAAGTTCCACTCTC	Van der Star <i>et al.</i> (2007)
Pla46f	Planctomicetos	GGATTAGGCATGCAAGTC	Schmid <i>et al.</i> (2000)
An1388r	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GCTTGACGGGCGGTGTG	Penton <i>et al.</i> (2006)
An7f	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GGCATGCAAGTCGAACGAGG	Penton <i>et al.</i> (2006)
Amx820r	Gêneros “ <i>Ca. Brocadia</i> ” and “ <i>Ca. Kuenenia</i> ”	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	Schmid <i>et al.</i> (2000)
Amx1240r	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TTTAGCATCCCTTTGTACCAACC	Schmid <i>et al.</i> (2000)
Brod541f	“ <i>Ca. Scalindua brodae</i> e <i>Scalindua wagneri</i> ”	GAGCACGTAGGTGGGTTTGT	Penton <i>et al.</i> (2006)
Brod1260r	“ <i>Ca. Scalindua brodae</i> e <i>Scalindua wagneri</i> ”	GGATTCGCTTCACCTCTCGG	Penton <i>et al.</i> (2006)
Eub1392r	Bactéria geral	ACGGGCGGTGTGTAC	Amann <i>et al.</i> (1995)

A condição de amplificação usada na PCR para os pares de iniciadores: Pla46F-Amx368R, Pla46F- Amx820R, Pla46F-Amx1240R, Pla46F-Amx667R, foi igual para todos os pares e

consistiu de: desnaturação inicial de 4 minutos à 94°C, 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação à 94°C, anelamento de 50 segundos à 56°C (exceto para o par Pla46F-Amx667R que foi de 55°C), extensão de 1 minuto à 72°C, e extensão final de 7 minutos à 72°C.

A condição de amplificação para os pares: Brod541F-Brod1260R e An7F-An1388R, seguiu as mesmas condições descritas por Penton *et al.* (2006), e consistiu de: desnaturação inicial à 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, anelamento à 60°C (para Brod541F-Brod1260R) ou à 63°C (para An7F/An1388R) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e extensão final à 72°C por 7 minutos.

Todos os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observados em um transiluminador de luz UV (UVP Products). As imagens dos géis foram registradas por um sistema de captura de imagem. Os marcadores de peso molecular utilizados foram i) GeneRuler de 1Kb (1 kilobases) e ii) O'GeneRuler 100 pb (com 100 pares de bases), ambos da marca Fermentas. As Figuras 4.8 e 4.9 ilustram os padrões utilizados, com as bandas de DNA e seus respectivos pesos moleculares.

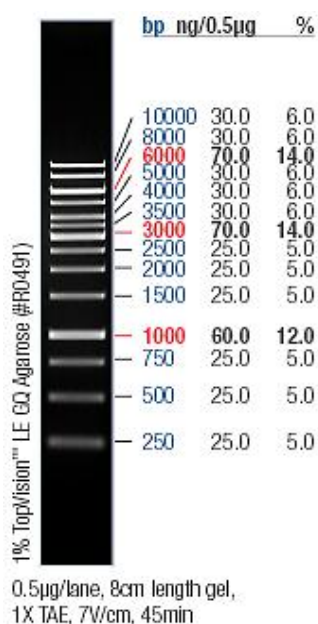


Figura 4.8 – Marcador de peso molecular, *GeneRuler* de 1Kb.

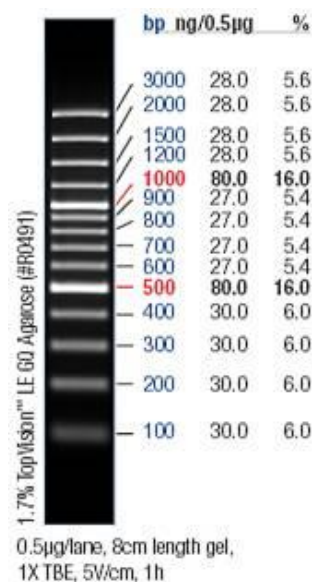


Figura 4.9 – Marcador de peso molecular, *O'GeneRuler* de 100 pb.

Tabela 4.10 – Concentração dos reagentes da PCR para a detecção de bactérias anammox

Reagentes	Concentração estoque	Concentração final por reação	Volume para reação de 25 µL
H ₂ O Mili-Q estéril	-	-	17,0 µL
Tampão de PCR	10X	1X	2,5µL
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,8µL
dNTPs	10 mM _{total}	200 µM _{total}	0,5 µL
Iniciador 1	10 µmol/µL	200 nM	0,75 µL
Iniciador 2	10 µmol/µL	200 nM	0,75 µL
Taq Polimerase	5U/µL	1U	0,2 µL
Amostra de DNA	-	1- 10 ng	2,5 µL

4.8.4 PCR com iniciadores específicos para bactérias oxidadoras de amônia e nitrito

Com o objetivo de se detectar bactérias nitrificantes (oxidadoras de amônia e de nitrito) que poderiam estar presentes na biomassa enriquecida no RBS, testou-se o DNA a partir das amostras enriquecidas, usando iniciadores específicos para o DNAr 16S de bactérias nitrificantes. Os iniciadores usados bem como as reações de amplificação foram realizadas de acordo com Rotthauwe *et al.* (1997), Vanparys *et al.* (2006), Degrange & Bardin (1995) e Dionisi *et al.* (2002) . As sequências dos iniciadores utilizados, bem como a especificidade dos mesmos, encontram-se descritos na Tabela 4.11. A reação de amplificação foi realizada de acordo com os volumes e concentrações de cada reagente descritos na tabela 4.12.

Tabela 4.11 – Iniciadores utilizados para a detecção de bactérias oxidadoras de amônia e nitrito

Iniciador	Especificidade	Sequência (5' → 3')	Referência
AmoA-1F	Gene da Amônia monooxigenase (<i>amoA</i>) de oxidadoras de amônia	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
AmoA-2R	Gene <i>amoA</i> de oxidadoras de amônia	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	Rotthauwe <i>et al.</i> (1997)
NxrB-1F	Gene da Nitrito oxidoreductase de <i>Nitrobacter</i> (subunidade Beta- <i>nxrB</i>)	ACGTGGAGACCAAGCCGGG	Vanparys <i>et al.</i> (2006)
NxrB-1R	Gene da Nitrito oxidoreductase de <i>Nitrobacter</i> (subunidade Beta- <i>nxrB</i>)	CCGTGCTGTTGAYCTCGTTGA	Vanparys <i>et al.</i> (2006)
FGPS872	Parte do gene RNAr 16S de <i>Nitrobacter</i> sp.	TTTTTTGAGATTTGCTAG	Degrange e Bardin (1995)
FGPS1269	Parte do gene RNAr 16S de <i>Nitrobacter</i> sp.	CTAAAACTCAAAGGAATTGA	Degrange e Bardin (1995).
NSR1113F	Parte do gene RNAr 16S de <i>Nitrospira</i> sp.	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	Dionisi <i>et al.</i> (2002)
NSR1246R	Parte do gene RNAr 16S de <i>Nitrospira</i> sp.	GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	Dionisi <i>et al.</i> (2002)

A condição de amplificação usada na PCR para os pares de iniciadores: AmoA-1F - AmoA-2R, NxrB-1F - NxrB-1R, FGPS872 – FGPS1269 e NSR1113F – NSR1246R, foi a mesma para todos eles e consistiu de: desnaturação inicial de 4 minutos à 94°C, 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação à 94°C, anelamento de 1 minuto à 50°C, extensão de 1 minuto à 72°C, e extensão final de 10 minutos à 72°C. Essa condição de amplificação seguiu o protocolo descrito por Geets *et al.* (2007).

Tabela 4.12 – Concentração dos reagentes da PCR para a detecção de bactérias anammox

Reagentes	Concentração estoque	Concentração final por reação	Volume para reação de 25 μ L
H ₂ O Mili-Q estéril	-	-	17,0 μ L
Tampão de PCR	10X	1X	2,5 μ L
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,8 μ L
dNTPs	10 mM _{total}	200 μ M _{total}	0,5 μ L
Iniciador 1	10 μ mol/ μ L	200 nM	0,75 μ L
Iniciador 2	10 μ mol/ μ L	200 nM	0,75 μ L
Taq Polimerase	5U/ μ L	1U	0,2 μ L
Amostra de DNA	-	1- 10 ng	2,5 μ L

4.9 Clonagem, sequenciamento e análise filogenética

A avaliação da comunidade microbiana enriquecida no RBS após 184 dias de cultivo (experimento 1), foi realizada através da amplificação (via PCR) do DNAr 16S e posterior clonagem e sequenciamento. O DNA isolado foi amplificado com os iniciadores Pla46F (específico para Planctomicetos) e Amx820R (específico para anammox), e Pla46F-1392R nas mesmas condições descritas por Egli *et al.* (2001). Os produtos de PCR foram inicialmente purificados, com o Kit de purificação Illustra GF x PCR DNA and Gel Band Purification, e posteriormente clonados com o Kit pGEM®-T e pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, E.U.A.), seguindo recomendações do fabricante. Os clones foram inseridos em células de *Escherichia coli* JM 109 de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento dos clones foi realizado pelo Serviço de Genomic (Genomic Engenharia Molecular Ltda, São Paulo, Brasil, www.genomic.com.br). Análises das 862 posições do gene RNAr 16S, amplificados com os iniciadores Pla46F-Amx820R e 1300bp relacionadas com os iniciadores Pla46F-1392R dos clones foram comparados com sequencias de DNAr 16S dos seus parentes mais próximos depositadas no banco de dados GenBank por meio de buscas BLASTN ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov / Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Posteriormente, análises moleculares filogenéticas e as relações evolutivas entre as sequencias foram realizadas utilizando o programa MEGA 4.1 (TAMURA *et al.*, 2007). O dendrograma

foi construído pelo método *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas usando método *Maximum Composite Likelihood* (Tamura *et al.*, 2004) e estão representadas em unidades de números de substituições de bases por sítio. Todas as posições contendo espaços nos alinhamentos e dados faltantes foram eliminadas em comparações de sequências (por pares) usando a opção *pairwise deletion*. Análises de *bootstrap* contendo 1.000 réplicas foram realizadas para verificar e estimar a confiabilidade e o arranjo das árvores filogenéticas.

Os números de acesso das sequências do gene RNAr 16S, depositados no GenBank/EMBL/DDBJ, dos 26 clones seqüenciados (obtidos neste trabalho), e utilizados para a construção das árvores filogenéticas são: GQ891677- GQ891680 e GQ896513- GQ896538.

Para o experimento II ainda estão em andamento as análises filogenéticas das amostras do inóculo e das amostras retiradas do reator após 80, 180, 244 e 347 dias de operação. Todas essas etapas de clonagem e análises filogenéticas foram (e estão sendo) realizadas no Laboratório da profa. Maria Helena Matté da faculdade de Saude Pública da Universidade de São Paulo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados dois experimentos (I e II) de enriquecimento de bactérias anammox, em épocas distintas, utilizando em ambos o mesmo inóculo e o fermentador, operado como Reator Sequencial em Batelada. Nos itens que se seguem são apresentados os resultados desses experimentos, em separado, além da caracterização do lodo de inóculo utilizado em cada um deles. No item 5.4 será feita uma discussão conjunta comparando ambos os experimentos.

5.1 Caracterização do lodo de inóculo

Em ambos os experimentos utilizou-se lodo proveniente do sistema de lodos ativados (da linha de recirculação do decantador secundário) da ETE ARRUDAS-COPASA da cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais, que trata esgoto doméstico. No primeiro experimento utilizou-se como inóculo 650 ml de lodo, o que resultou em 2,6g de STV em 1 L de meio mineral autotrófico. Alíquotas desse lodo foram separadas e parte foi congelada a -20°C para posterior extração de DNA e parte fixada para realização das análises de FISH. Após a extração do DNA reações de PCR foram realizadas. As análises de FISH, não revelaram a presença de bactérias anammox no lodo de inóculo, indicando que elas poderiam estar presentes, mas em concentração muito baixa, abaixo do limite de detecção da técnica, cerca de 10^3 a 10^4 células/ml (AMANN *et al.*, 1995).

O resultado da PCR para o lodo de inóculo, com o par de iniciadores An7F e An1338R, que detecta todos os organismos anammox (*Ca. Brocadia*, *Ca. Kuenenia* e *Ca. Scalindua*), foi positivo indicando a presença de DNAr 16S de bactérias anammox nesse lodo (Figura 5.1), apesar deste não ter apresentado atividade anammox prévia. Portanto, este resultado indica que as anammox estavam presentes no lodo ativado antes do experimento de enriquecimento. Não obstante, em um experimento em batelada (LARA, 2009), este lodo não apresentou atividade anammox, mesmo após 300 dias de incubação em meio autotrófico e anaeróbio.

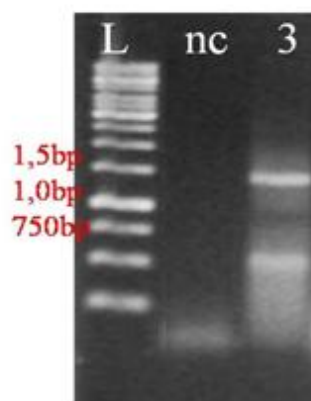


Figura 5.1 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de anammox com iniciadores An7F e An1388R no lodo ativado usado como inóculo no RBS (3); (L) é o Marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas) e (nc) é o controle negativo da reação da PCR

No experimento II utilizou-se como inóculo 1500 ml de lodo, contendo 6,9g de STV em 1 L de meio mineral autotrófico. Assim como no experimento 1, alíquotas do lodo foram separadas e parte foi congelada a -20°C para posterior extração de DNA, parte fixada para realização das análises de FISH e parte utilizada para quantificação das bactérias nitrificantes e desnitrificantes através da técnica do Número Mais Provável (NMP). Após a extração do DNA reações da PCR foram realizadas.

Da mesma forma que no experimento I, as análises de FISH não revelaram a presença de bactérias anammox no inóculo, indicando que elas poderiam estar presentes, mas em concentração muito baixa, abaixo do limite de detecção da técnica. Entretanto, os resultados da PCR com iniciadores específicos para Planctomicetos foram positivos (Figura 5.2), sugerindo que as bactérias anammox poderiam estar presentes no lodo de inóculo (uma vez que fazem parte da ordem Planctomicetales), mesmo sem o lodo apresentar atividade anammox prévia.

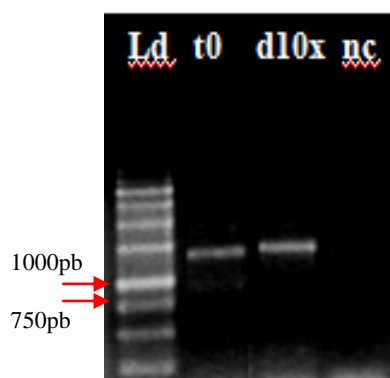


Figura 5.2 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de Planctomicetos com iniciadores Pla46F e Eub1392R no lodo ativado usado como inóculo no RBS; onde (t0) é o DNA extraído do lodo ativado (DNA concentrado), (d10x) é a amostra de DNA diluída 10 vezes extraída do Lodo ativado, (Ld) é o Marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas) e nc é o controle negativo da reação da PCR

Os resultados da determinação do número mais provável (NMP), de bactérias nitrificantes e desnitrificantes, são apresentados na tabela 5.1. As bactérias nitrificantes, tanto oxidadoras de amônia quanto oxidadoras de nitrito, apresentaram valores menores que $1,8 \times 10^8$ NMP/mL, indicando que essas bactérias apesar de estarem presentes em altas concentrações, na faixa de 10^{14} NMP/mL no lodo ativado do tanque de aeração (CAMPOS & ARAÚJO, 2010), estavam presentes em quantidades inferiores no lodo proveniente da linha de recirculação do decantador secundário.

Entretanto, com relação às bactérias desnitrificantes, as quais são anaeróbias, verificou-se valor maior que $1,6 \times 10^{18}$ NMP/mL, sugerindo que o lodo da etapa de recirculação apresenta características anaeróbias. Esse resultado é corroborado pela pequena quantidade de bactérias nitrificantes encontradas, as quais, provavelmente sofreram decréscimo em sua população quando o lodo deixou o taque de aeração do sistema de Lodos ativados, e seguiu para o decantador secundário (e posteriormente para a linha de recirculação), onde provavelmente prevaleceram condições anóxicas. Sendo assim, o lodo utilizado como inóculo, apesar de ser proveniente de um sistema de tratamento aeróbio, apresenta Zonas de Mínimo Oxigênio (ZMO), o que deve ter favorecido a presença de bactérias anammox, em coexistência com pequenas quantidades de bactérias nitrificantes, e um grande número de bactérias desnitrificantes.

Tabela 5.1 – Determinação do NMP de bactérias nitrificantes e desnitrificantes no lodo de inóculo pela técnica de tubos múltiplos

Grupo bacteriano	NMP/mL
Oxidadoras de amônia	$< 1,8 \times 10^8$
Oxidadoras de nitrito	$< 1,8 \times 10^8$
Desnitrificantes	$> 1,6 \times 10^{18}$

5.2 Experimento I

5.2.1 Monitoramento analítico do reator

A Figura 5.3 apresenta os resultados das concentrações de amônia e nitrito afluente e efluente ao longo dos 420 dias de operação do reator. De acordo com os resultados obtidos, os perfis de concentração de amônia e de nitrito podem ser divididos em quatro fases: (I) fase inicial; (II) fase de propagação; (III) fase anammox; (IV) fase de declínio e (V) fase de recuperação. A fase inicial de operação, com duração de 20 a 25 dias, foi marcada pelo consumo intenso de nitrito sem que houvesse consumo de amônia, pelo contrário houve aumento da concentração efluente deste composto. Nesta fase a desnitrificação foi o processo favorecido (devido à atmosfera anaeróbia e presença de nitrito), eliminando a matéria orgânica presente no meio. A morte e lise das bactérias aeróbias presentes no lodo de inóculo ocasionou a liberação de nitrogênio orgânico e quebra deste em amônia. Na Figura 5.4 a liberação de amônia no meio está evidenciada pelos valores negativos na eficiência de remoção deste composto durante os 25 dias iniciais. Após a lise das bactérias aeróbias, teve início a morte e lise das bactérias desnitrificantes devido a ausência de substratos orgânicos no meio, uma vez que o meio de cultura era autotrófico.

A fase de propagação, durou cerca de 75 dias (do 20º dia até o 95º dia de operação) e foi marcada pela exaustão completa dos substratos orgânicos, resultando na eliminação da atividade desnitrificante. As concentrações de nitrito efluente nesta fase foram próximas às concentrações afluentes, pois este aceptor final de elétrons não estava mais sendo consumido. A partir desse momento, as condições do sistema devem ter favorecido o aumento da população anammox. Este aumento culminou no aparecimento da atividade anammox (marcada pelo consumo simultâneo de amônia e de nitrito), que foi detectada a partir do 87º dia de operação (Figura 5.3). De acordo com a literatura (DAPENA-MORA *et al.*, 2004,

THIRD *et al.* 2005, e CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007) o início da atividade anammox em reator em batelada sequencial pode acontecer após 70 a 120 dias de operação do reator. Portanto, o sistema começou a responder dentro do que foi observado pela literatura. Durante a fase de propagação (fase II), a eficiência de remoção de amônia e de nitrito foi variável de 0 a 40% (Figura 5.4), indicando pequeno consumo desses compostos.

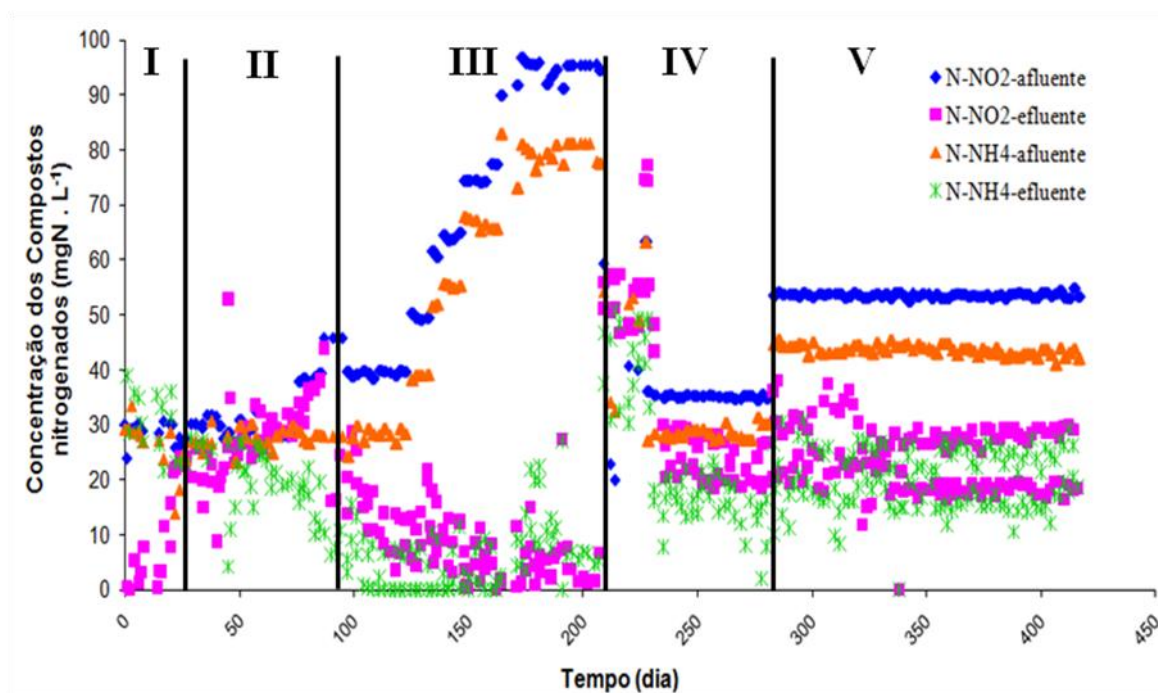


Figura 5.3 - Concentração afluente e efluente dos compostos nitrogenados (N-NH_4^+ e N-NO_2^-) no RBS ao longo do tempo de operação

A fase anammox (considerada a partir do 90º dia de operação), fase III, permitiu atingir a remoção quase que completa de amônia no sistema. Neste período as concentrações de amônia e nitrito efluente variaram de 10 mg/l à quase 0 mg/l (Figura 5.3). A partir do 125º dia de operação, as concentrações de amônia e nitrito foram aumentadas gradativamente, sempre respeitando a relação de 1:1,26 ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^-$). Nesta mesma fase a eficiência de remoção de amônia e nitrito por parte do lodo foi aumentando atingindo cerca de 90% (Figura 5.4). Além disso, o coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito em relação à amônia, calculado a partir dos dados do RSB (Figura 5.5), a partir do 90º dia de operação, foi relativamente próximo ao valor descrito na literatura para a reação anammox ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^- : 1 : 1,32$, STROUS *et al.*, 1998), demonstrando que o lodo ativado após 90 dias de cultivo em meio autotrófico e anaeróbico desenvolveu atividade anammox.

A quarta fase de operação, chamada de declínio, foi marcada pela diminuição e quase ausência da atividade anammox, entre os dias 208 até 280. O sistema, dez dias antes de apresentar declínio da atividade anammox, teve o TDH aumentado de 24 para 48 horas (do 196° até o 207° dia de operação) e, conseqüentemente, a carga de nitrogênio aplicada foi reduzida a metade (de 0,18 para 0,09 kg N/m³. dia). Nesses onze dias a remoção de amônia e de nitrito foi de quase 100%, indicando que o reator não sentiu com o aumento no TDH. Não obstante, após os 11 dias (a partir do 208° dia de operação), quando o TDH foi reduzido para 24 horas, verificou-se que as concentrações efluentes de amônia e de nitrito estavam altas (em torno de 46 e 55 mg/l, respectivamente) indicando que estes compostos não estavam sendo removidos totalmente. Nesse período as eficiências de remoção de amônia e de nitrito caíram, de 90% para cerca de 10 a 15%, ou apresentaram valores negativos (no caso do nitrito). Na tentativa de evitar a toxicidade causada pelo nitrito, a concentração deste composto no afluente foi reduzida de 96mg/l para 35 mg/l permanecendo nesta concentração por 60 dias. A concentração de amônia afluente também foi reduzida de 77 mg/l para 29 mg/l (Figura 5.3).

Em conseqüência deste fato, quando o TDH voltou a ser de 24 horas (207° dia), o reator deve ter sofrido um choque de carga, no qual a elevada concentração de nitrito (96 mg/L de N-NO₂) ocasionou a inibição da atividade anammox. A partir do 210° dia as concentrações efluentes de nitrito e amônia apresentaram valores próximos das concentrações afluentes desses íons. Portanto, a eficiência de remoção de amônia e nitrito tornou-se bastante reduzida. Nesse mesmo período (do 210° ao 280° dias de operação) essa redução na atividade anammox também pode ser constatada pela redução do coeficiente estequiométrico para 0,7 (Figura 5.5). Conforme comentado anteriormente, esse declínio provavelmente ocorreu devido à redução da taxa de aplicação de Nitrogênio por 10 dias e posterior aumento. Após esse período, do 300° ao 380° dia de operação verificou-se uma recuperação do processo anammox, constatado pelo aumento do coeficiente estequiométrico para 1,1, se aproximando novamente do valor previsto na literatura (1,32).

Tsushima *et al.*(2007) reportaram fato semelhante em um reator, para enriquecimento de biomassa Anammox, no qual a taxa de remoção de nitrogênio foi reduzida quando a concentração afluente de nitrogênio foi aumentada para 1000 mg/L. Provavelmente a toxicidade do nitrito residual (224±10mg-N/L), neste caso, estava acima dos níveis inibitórios de nitrito (70-180 mg-N/L) sugeridas previamente por Strous *et al.* (1999b), ou possivelmente pode ter havido acúmulo de subprodutos, ainda desconhecidos, derivados da reação anammox

(TSUSHIMA *et al.*, 2007). Sendo assim, no presente trabalho, a redução do TDH ocasionou um aumento nas taxas de carregamento de nitrogênio, provocando a inibição da atividade Anammox no reator devido à alta concentração de nitrito presente no mesmo.

Em face disso, a partir do 225º de operação as concentrações afluentes de nitrito e amônia foram reduzidas, sempre respeitando a relação de 1:1,26 ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^-$), dando início a quinta fase, denominada de recuperação (Figura 5.4). Esta fase se iniciou no 283º dia de operação e foi até o 380º dia. Neste período a eficiência de remoção de amônia e nitrito por parte do lodo se manteve na faixa de 30 a 55% (Figura 5.4).

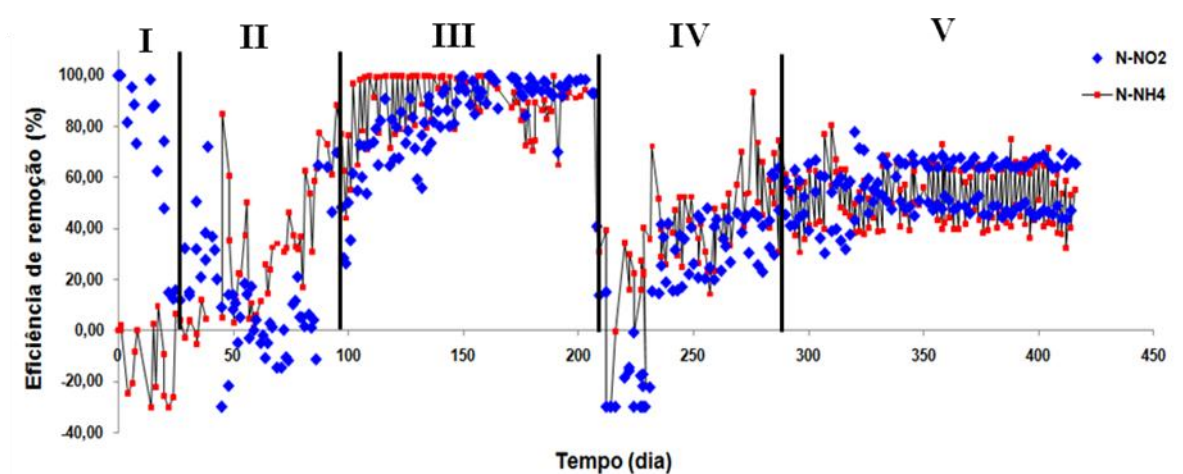


Figura 5.4 - Eficiência de remoção de amônia e nitrito pelo lodo cultivado no RBS ao longo do tempo de operação

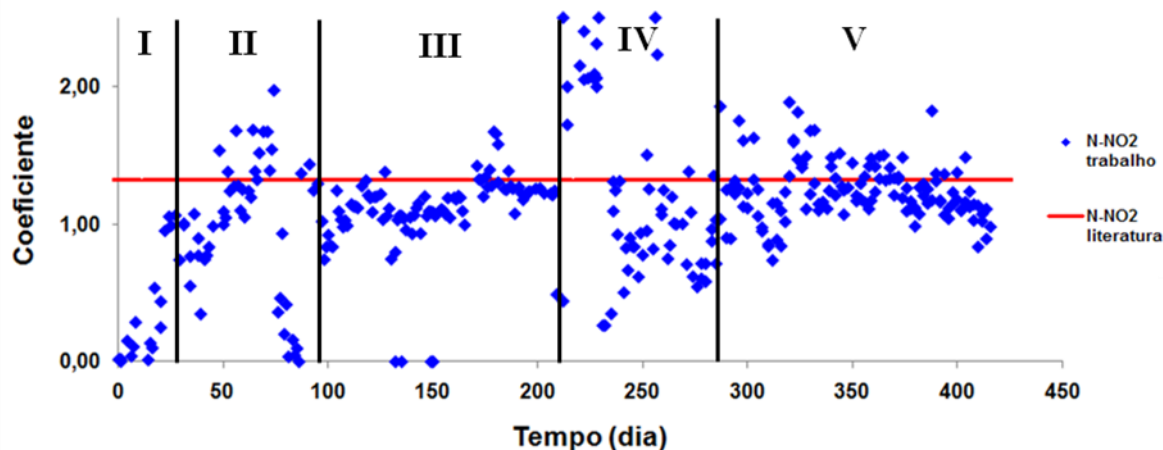


Figura 5.5 - Coeficiente estequiométrico do nitrito em relação à amônia, de acordo com os dados de consumo de nitrogênio do reator obtidos neste trabalho, ao longo do tempo de operação

5.2.2 Detecção das bactérias anammox pela técnica da PCR

Os resultados da PCR com iniciadores específicos para as anammox demonstraram a presença de DNAr 16S dessas bactérias tanto no lodo de inóculo, quanto no lodo enriquecido no RBS após 181 dias de cultivo em meio autotrófico e anaeróbio (Figura 5.6). Uma vez que o DNA da biomassa cultivada apresentou produto de PCR com a mesma intensidade do produto amplificado a partir do DNA do lodo de inóculo, e o controle negativo (sem DNA), não apresentou qualquer sinal (Figura 5.6), pode-se sugerir que as bactérias anammox estavam presentes no lodo ativado antes do experimento de enriquecimento. Não obstante, em um experimento em batelada (LARA, 2009), o lodo ativado (usado como inóculo) não apresentou atividade anammox, mesmo após 300 dias de incubação em meio autotrófico e anaeróbio.

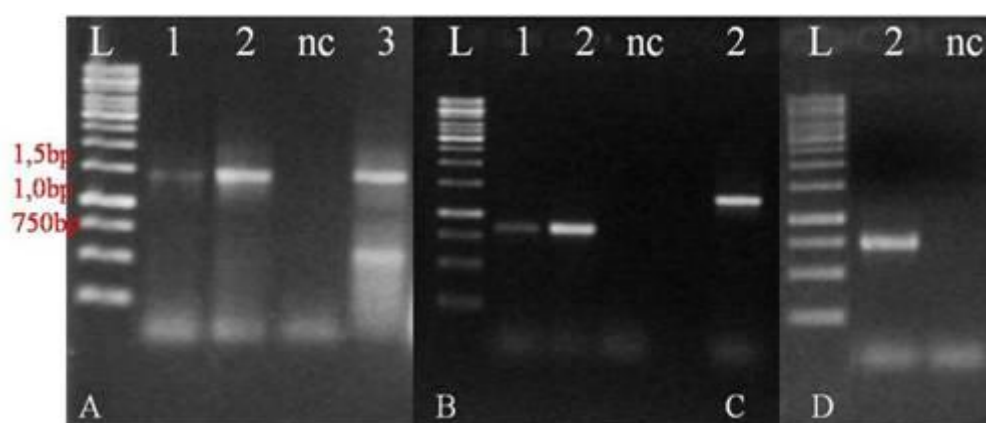


Figura 5.6 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de anammox com iniciadores An7F e An1388R (painel A), Pla46F e Amx820R (painel B), Pla46F e Amx1240R (painel C), e Pla46F e Amx667R (painel D). L é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (1) Lodo do RBS após 181 dias de enriquecimento (DNA diluído 10 vezes), (2) Lodo do RBS após 181 dias de enriquecimento (DNA concentrado); (3) lodo de inóculo; nc é o controle negativo da reação da PCR

Ao final do experimento I (420º dia de operação) foi coletada biomassa do reator e realizada a PCR com iniciadores específicos para as anammox (Figura 5.7). Os resultados indicaram que a presença das bactérias anammox foi constante no reator até o final do experimento.

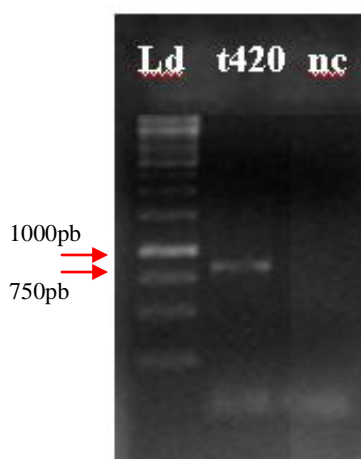


Figura 5.7 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de anammox com iniciadores Pla46F e Amx820R, onde (Ld) é o Marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t420) é o lodo do RBS após 420 dias de enriquecimento (DNA concentrado) e nc é o controle negativo da reação da PCR

5.2.3 Detecção e quantificação das bactérias anammox pela técnica de FISH

As análises de FISH, não revelaram a presença das anammox no lodo de inóculo, indicando que elas poderiam estar presentes, mas em concentração muito baixa, abaixo do limite de detecção da técnica, cerca de 10^3 a 10^4 células/ml (AMANN *et al.*, 1995). Porém, os resultados com a amostra da biomassa enriquecida no RBS após 181 dias de cultivo, revelaram a presença de bactérias anammox, que hibridaram com as sondas Amx820 (dados não apresentados) e Amx1240 (Figura 5.8), confirmando o enriquecimento das bactérias anammox (provavelmente do gênero *Brocadia*) neste lodo.

A quantificação dessas bactérias, através da contagem do número de células hibridadas com a sonda Amx1240, revelou que 53% do total de células do enriquecimento eram anammox. Conforme descrito previamente para *Candidatus B. anammoxidans* (STROUS, 2000), as células enriquecidas no presente trabalho apresentaram morfologia arredondada, e uma região escura (quase sem fluorescência) no centro da célula. Esta área central, ausente de ribossomos e de DNA (pois não corou com DAPI), deve ser presumivelmente uma região rica em proteína similar ao anammoxossomo de *Ca. B. anammoxidans*.

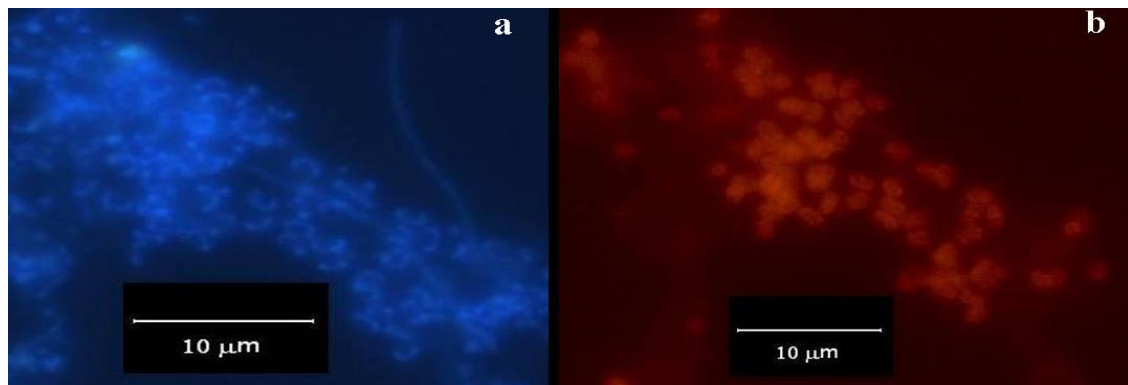


Figura 5.8: Análise de FISH da biomassa cultivada no RBS após 181 dias de enriquecimento. Células coradas com DAPI em *a*; e células hibridadas com a sonda Amx1240 (específica para *Ca. Brocadia*) em *b*. A barra nas imagens *a* e *b* representa 10 μm

Nos dias 235 e 331 de operação, foram realizadas novas análises de FISH com a biomassa do RBS, porém não foi mais possível fazer a contagem das células hibridadas, devido a ocorrência de poucas células com morfologia característica das anammox (observada na Figura 5.8 e que hibridaram com a sonda). Este resultado sugere que as anammox diminuíram em proporção, caindo de 52,7% do total de células do enriquecimento (com 181 dias de cultivo), para 1% ou menos do total de células (nos dias 235 e 331). Comparando esses resultados com aqueles de eficiência de remoção de amônia e de nitrito, verifica-se que quando as anammox eram dominantes a eficiência de remoção de amônia e de nitrito estava em torno de 90 a 95%. Quando as anammox não foram mais detectadas pela técnica de FISH a eficiência de remoção do sistema estava em torno de 40 a 60%. Apesar das bactérias anammox, na última fase de operação do RBS, não terem sido mais detectadas pelo FISH, foram detectadas pela PCR, conforme resultado apresentado na Figura 5.7.

5.2.4 Identificação filogenética da biomassa enriquecida

Foram construídas duas bibliotecas de clones a partir do gene RNAr 16S com o DNA extraído da biomassa enriquecida no RBS após 184 dias de cultivo, usando os iniciadores. Pla46F-Amx820R e Pla46F-1392R. Trinta clones foram selecionados ao acaso e sequenciados. Desses, 26 clones (JCA4- GQ891680; e do JCA7- GQ896514 ao JCA30-GQ896538) foram agrupados como sendo do mesmo filotipo uma vez que suas sequências apresentaram similaridade maior que 99%. Esses clones estavam proxicamente relacionados (apresentaram 99% de identidade) com a sequência de uma nova espécie de anammox denominada de

Candidatus Brocadia sinica (GQ 175277) (Hu *et al.*, 2010), pertencente ao grupo dos Planctomicetos (Figura 5.9).

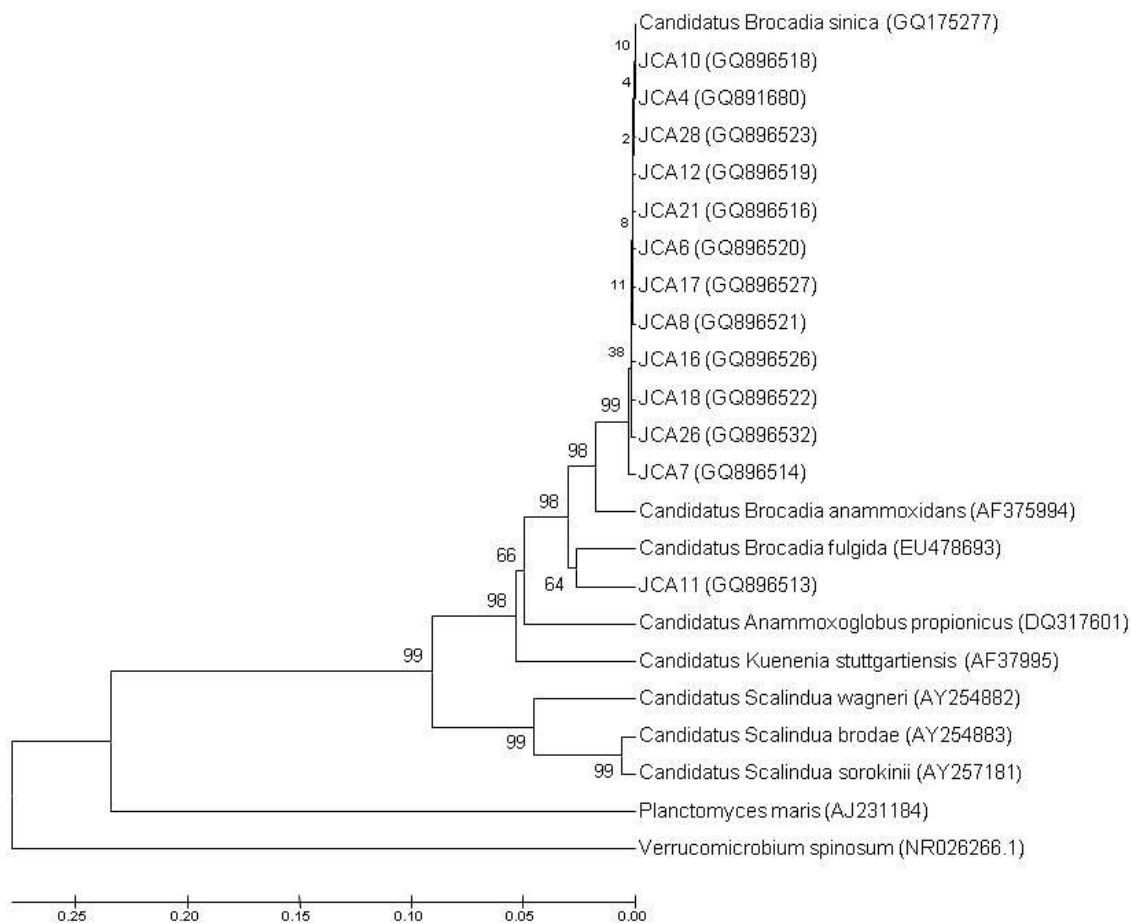


Figura 5.9: Dendrograma de distância evolutiva mostrando a afiliação filogenética das sequências de 862 pb do gene RNAr 16S obtidas no presente trabalho a partir da biomassa do RBA (após 184 dias de enriquecimento), em relação aos membros do domínio Bactéria.

Os números nos nós da árvore representam a porcentagem de recuperação dos braços relevantes em 1000 análises de re-amostragens por “bootstrap”. O número de acesso das sequências depositadas no GenBank e no EMBL estão indicadas entre parênteses. A barra de escala representa a diferença estimada nas posições dos nucleotídeos das sequências

Entretanto, um clone (JCA11), dentre os 30, embora relacionado com a sequência de *Ca. Brocadia fulgida*, apresentou maior afiliação com a sequência de *Brocadia* sp. 40 (com cerca de 98% de identidade entre as sequências), sugerindo portanto que este clone poderia representar uma espécie nova dentro do gênero *Candidatus Brocadia*, baseado nas similaridades de sequências geralmente usadas para definir diferentes espécies (ROSELLO-

MORA & AMANN, 2001) (Figure 5.10). Assim, propõem classificar, provisoriamente, esta nova espécie de anammox de *Candidatus Brocadia brasiliensis* de acordo com as recomendações taxonômicas. Três clones (dentre os 30), JCA1, JCA2, e JCA3, embora relacionados com o grupo Planctomicetos, foram agrupados separadamente (dados não apresentados).

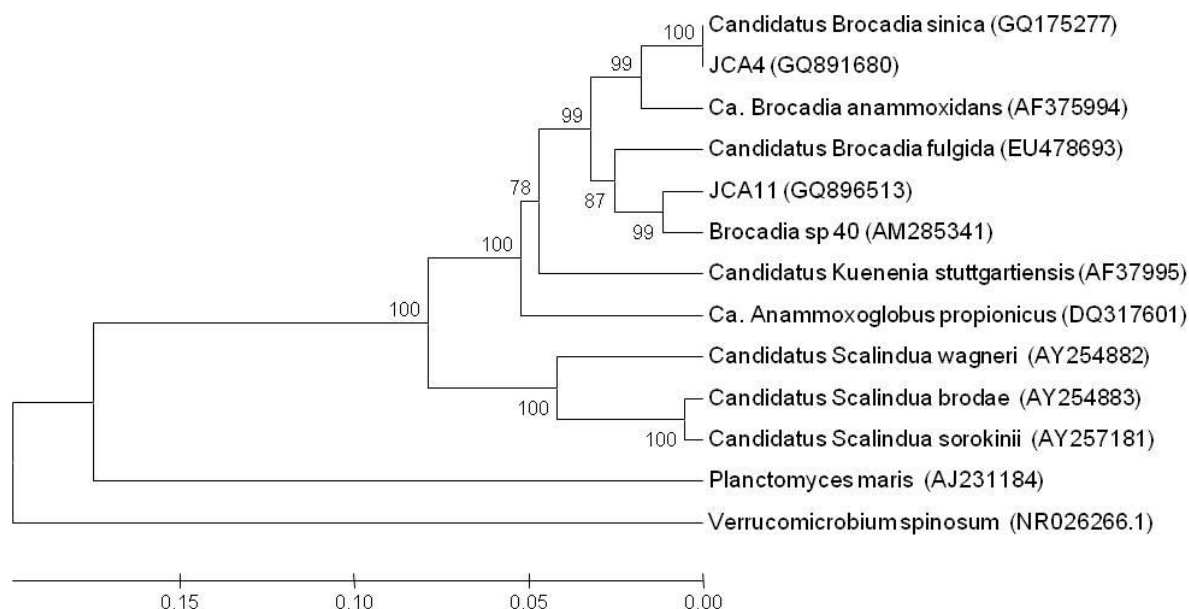


Figura 5.10: Árvore filogenética de anammox apresentando a posição dos clones JCA4 e JCA11, obtidos a partir do RBS após 184 dias de operação. A árvore foi construída utilizando fragmento de 862pb do gene RNAr 16S. Os números nos nós da árvore representam a porcentagem de recuperação dos braços relevantes em 1000 análises de reamostragens por “bootstrap”. O número de acesso das sequências depositadas no GenBank e no EMBL estão indicadas entre parênteses. A barra de escala representa a diferença estimada nas posições dos nucleotídeos das sequências

5.3 Experimento II

5.3.1 Monitoramento analítico do reator

Com o intuito de se aprofundar os conhecimentos a respeito das bactérias anammox e da comunidade microbiana que coexiste com as oxidadoras anaeróbias de amônia um novo experimento foi realizado, no qual foram testadas diferentes condições de enriquecimento. Tais condições consistiram na utilização de um volume maior de inóculo, acarretando maior concentração de STV, pois assim esperava-se detectar atividade anammox no lodo em um

espaço menor de tempo. Além disso, as concentrações de amônia e nitrito iniciais apresentaram a relação de 1 para 1,26, ou seja, 46 mg/L de N-NO₂ em relação a 32 mg/L de N-NH₄, ao passo que no experimento I a proporção inicial foi de 1 para 1 (30 mg/l de NH₄ e 30 mg/l de NO₂). Além do mais, no experimento I o aumento gradativo das concentrações de amônia e nitrito aconteceu após 90 dias de experimento, enquanto que no experimento II, este aumento ocorreu após 170 a 180 dias. Entretanto, o cultivo continuou a ser feito no RBS, o TDH de 24 horas e a composição do meio mineral autotrófico foram mantidos.

As Figuras 5.11 e 5.12 apresentam os resultados das concentrações de amônia e nitrito afluente e efluente para os ciclos de 7 e 17 horas de operação em batelada sequencial, respectivamente, ao longo dos 420 dias de monitoramento do reator. Vale salientar que cada ciclo compreendeu três fases: entrada do meio de cultura (6 h), sedimentação da biomassa (0,5 h), e retirada do meio (0,5 h). Para o ciclo mais longo (de 17 horas), após as 6 horas de enchimento do reator, a biomassa ficou reagindo com o meio de cultura por mais 10 horas. A apresentação dos perfis de concentração de amônia e nitrito para cada um dos ciclos, separadamente, se justifica em função de ter ocorrido diferença significativa nas eficiências de remoção dos compostos nitrogenados entre os dois ciclos de operação, o que não ocorreu no experimento I. De acordo com os resultados obtidos, os perfis de concentração de amônia e de nitrito podem ser divididos em cinco fases: (I) fase inicial, (II) fase de propagação e de atividade anammox inicial, (III) fase anammox, (IV) fase de ligeiro declínio e (V) fase de recuperação.

Assim como no experimento I, a fase inicial de operação, com duração de 35 a 40 dias, foi marcada pelo consumo intenso de nitrito sem que houvesse consumo de amônia, pelo contrário houve aumento da concentração efluente deste composto. Nesta fase a desnitrificação foi o processo favorecido (devido à atmosfera anaeróbia e presença de nitrito), eliminando a matéria orgânica presente no meio. A morte e lise das bactérias aeróbias presentes no lodo de inóculo ocasionou a liberação de nitrogênio orgânico e quebra deste em amônia. Nas Figuras 5.13 e 5.14 a liberação de amônia no meio está evidenciada pelos valores negativos na eficiência de remoção deste composto (nos 20 dias iniciais). Após a lise das bactérias aeróbias, teve início a morte e lise das bactérias desnitrificantes devido a ausência de substratos orgânicos no meio (uma vez que o meio de cultura era autotrófico).

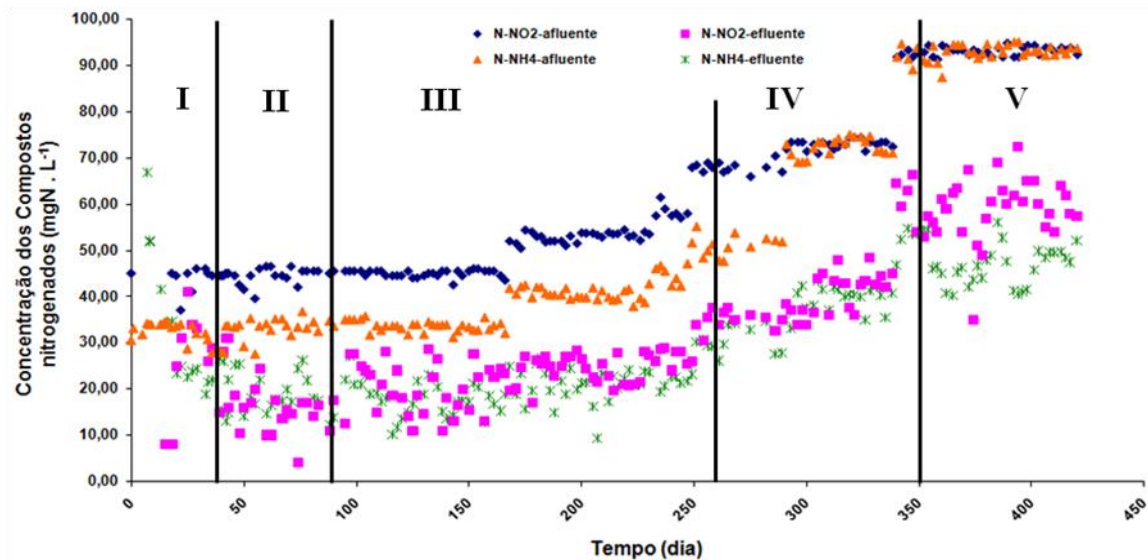


Figura 5.11 - Concentração afluente e efluente dos compostos nitrogenados (N-NH_4^+ e N-NO_2^-) no RBS ao longo do tempo de operação do reator para o ciclo de 7 horas em batelada sequencial

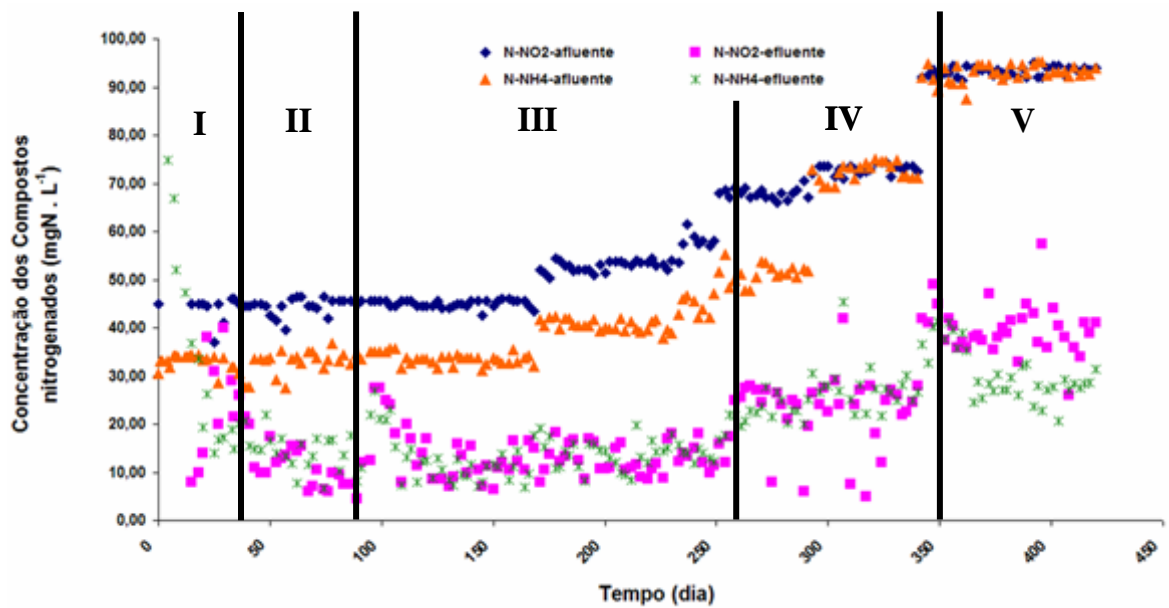


Figura 5.12 - Concentração afluente e efluente dos compostos nitrogenados (N-NH_4^+ e N-NO_2^-) no RBS ao longo do tempo de operação para o ciclo de 17 horas de operação em batelada sequencial

A fase de propagação durou cerca de 30 dias (do 40º dia até o 70º dia de operação) e foi marcada pela exaustão completa dos substratos orgânicos, resultando na eliminação da atividade desnitrificante. A partir desse momento, as condições do sistema devem ter favorecido o aumento da população anammox, pois o início da atividade anammox (marcada

pelo consumo simultâneo de amônia e de nitrito) ocorreu após 50 dias de cultivo (Figuras 5.11 e 5.12). Apesar disso, a eficiência de remoção de amônia e de nitrito neste início foi variável, ficando em torno de 30 a 60% (Figuras 5.13 e 5.14). Após 50 dias e a partir de 90 – 100 dias foi que o sistema apresentou valores maiores de eficiência de remoção de amônia e de nitrito (Figuras 5.13 e 5.14). Portanto a partir de 90 dias, intensa atividade anammox foi observada (principalmente considerando o ciclo de reação mais longo- Figura 5.14). De acordo com a literatura (DAPENA-MORA *et al.*, 2004, THIRD *et al.* 2005, e CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007), o início da atividade anammox em reator em batelada sequencial pode acontecer após 70 a 120 dias de operação do reator. Portanto, o sistema neste caso começou a responder antes do observado na literatura, provavelmente devido ao maior volume de inóculo utilizado neste experimento. Durante a fase de propagação, a eficiência de remoção de amônia e de nitrito variou de 20 a 70% (Figuras 5.13 e 5.14), indicando consumo desses compostos. Nota-se, claramente, que a eficiência de remoção tanto de amônia quanto de nitrito foi maior no ciclo mais longo, de 17 horas, quando comparado ao ciclo curto, de 7 horas de duração.

A fase III - de intensa atividade anammox (considerada a partir do 90º dia de operação), permitiu atingir remoção de cerca de 50 a 80% de amônia no sistema (Figuras 5.13 e 5.14). Neste período as concentrações de amônia e nitrito efluente variaram de 30 mg/l à quase 15 mg/l (Figuras 5.11 e 5.12). A partir do 170º dia de operação, as concentrações de amônia e nitrito foram aumentadas gradativamente, sempre respeitando a relação de 1:1,26 ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^-$). Nesta mesma fase a eficiência de remoção de amônia e nitrito por parte do lodo se manteve em torno de 75%, atingindo em alguns momentos 90%, no ciclo de operação com duração de 17 horas (Figuras 5.13 e 5.14).

O coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito em relação à amônia calculados por meio dos dados obtidos, a partir do 100º dia de operação, esteve em torno de 1,0 e, portanto, foi relativamente próximo ao valor descrito na literatura para a reação anammox ($\text{NH}_4^+ : \text{NO}_2^- : 1 : 1,32$ STROUS *et al.*, 1998), (Figura 5.15), demonstrando que o lodo ativado após, aproximadamente, 100 dias de cultivo em meio autotrófico e anaeróbico atingiu atividade anammox constante. A utilização de um volume maior de inóculo neste segundo experimento (1500 mL) em comparação com aquele usado no primeiro experimento (650 mL), não garantiu a obtenção de eficiências de remoção maiores que 90% (observadas no primeiro experimento). Não obstante, a utilização de mais inóculo no experimento II pode ter

favorecido a detecção de atividade anammox mais cedo no enriquecimento (com 50 dias), em comparação com o experimento I (no qual atividade anammox foi observada somente após 90 dias).

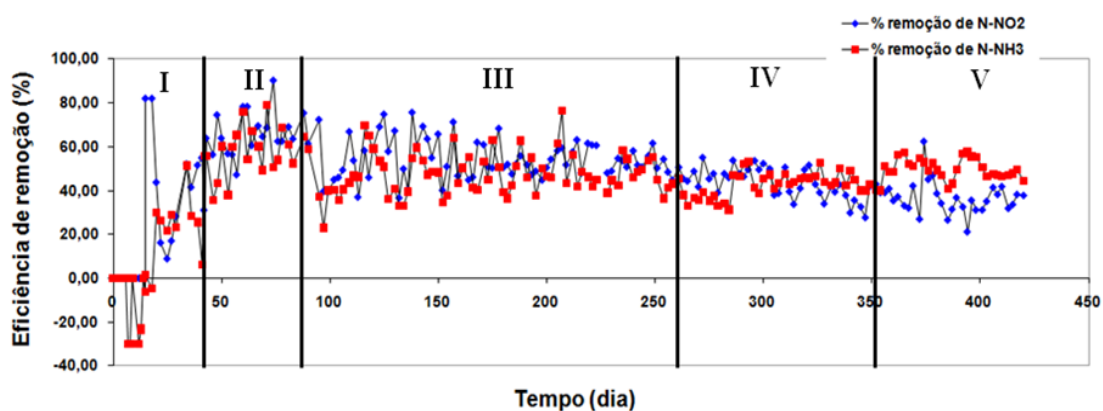


Figura 5.13 - Eficiência de remoção de amônia e nitrito pelo lodo cultivado no RBS ao longo do tempo de operação para o ciclo de 7 horas de operação em batelada seqüencial

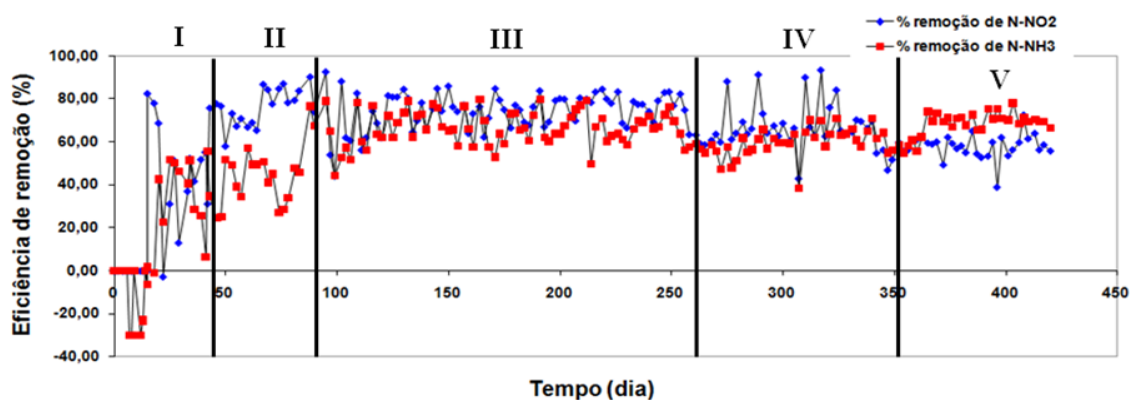


Figura 5.14 - Eficiência de remoção de amônia e nitrito pelo lodo cultivado no RBS ao longo do tempo de operação para o ciclo de 17 horas de operação em batelada seqüencial

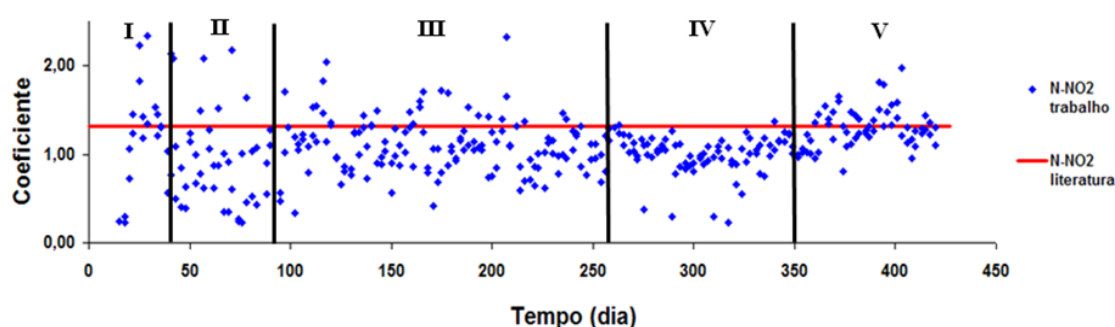


Figura 5.15 - Coeficiente estequiométrico do nitrito em relação à amônia ($N-NO_2^-/N-NH_4^+$), em relação ao coeficiente estequiométrico padrão para o ciclo de 17 horas de operação em batelada sequencial

A quarta fase de operação, chamada de declínio, foi marcada pela diminuição da atividade anammox, entre os dias 255 até 350. Essa diminuição foi evidenciada pela redução dos valores de eficiência de remoção dos compostos nitrogenados, de 60% para 40%, no ciclo de 7 horas, e de 75% para 60% no ciclo de 17 horas (Figuras 5.13 e 5.14, respectivamente). O fermentador, no início da fase de declínio, apresentou problemas na manta aquecedora e no sensor de temperatura, conseqüentemente nesta fase o reator não foi operado à 34°C, mas sim permaneceu à temperatura ambiente (cerca de 21 a 26°C). Tal variação na temperatura de operação do sistema pode ter contribuído para o ligeiro declínio da atividade anammox, indicando que o metabolismo dessas bactérias deve ter sofrido com a queda da temperatura. Segundo Strous *et al.* (1999b), as condições de temperatura favoráveis para o crescimento das anammox ocorrem entre 20 e 43°C (sendo que a temperatura ótima é de 40°C).

Não obstante, quando se observa o coeficiente estequiométrico da reação para esse mesmo período, verifica-se que este se manteve acima de 1,0 e próximo ao valor descrito na literatura (Figura 5.15), evidenciando que a atividade anammox continuou ocorrendo. Além disso, ao contrário do experimento I, as concentrações afluentes de nitrito e amônia não foram reduzidas, mas foram aumentadas gradativamente (Figuras 5.11 e 5.12), uma vez que, nesse caso, o ligeiro declínio na atividade ocorreu provavelmente devido à alteração na temperatura e não ao choque de carga afluente.

Na metade da fase de declínio o sensor de temperatura teve seu funcionamento normalizado e, portanto, o reator voltou a ser operado à 34°C, aproximadamente. Não obstante, a biomassa ainda levou algum tempo para se recuperar da queda de temperatura ocorrida anteriormente. A partir do 351º dia de operação, aproximadamente, teve início a quinta fase de enriquecimento, denominada de recuperação (Figuras 5.11 e 5.12), que seguiu até o final do experimento (420º dia de operação). Neste período a eficiência de remoção de amônia e nitrito por parte do lodo se manteve na faixa de 60% a 80% (Figuras 5.13 e 5.14), sugerindo que a biomassa se restabeleceu. As concentrações de amônia e nitrito nessa fase final foram mantidas constantes, mas com valor elevado em relação à fase anterior (Figuras 5.11 e 5.12), porém, não houve diminuição da eficiência de remoção por isso. Com relação ao coeficiente estequiométrico da reação, este também se manteve bastante próximo a 1,32, durante a fase V (Figura 5.15), outro indício do aumento da atividade e metabolismo por parte das bactérias anammox.

5.3.2 Detecção das bactérias Anammox pela técnica da PCR

Os resultados da PCR com iniciadores específicos para Planctomicetos e para as anammox demonstraram a presença de DNAr 16S dessas bactérias, respectivamente, tanto no lodo de inóculo, quanto na biomassa enriquecida no RBS após 80, 180, 244 e 347 dias de cultivo (Figura 5.16), sugerindo que as anammox estavam presentes no lodo de inóculo antes do enriquecimento, bem como permaneceram presentes ao longo de todo o experimento. Resultados semelhantes foram obtidos no experimento I, realizado anteriormente, com o mesmo inóculo.

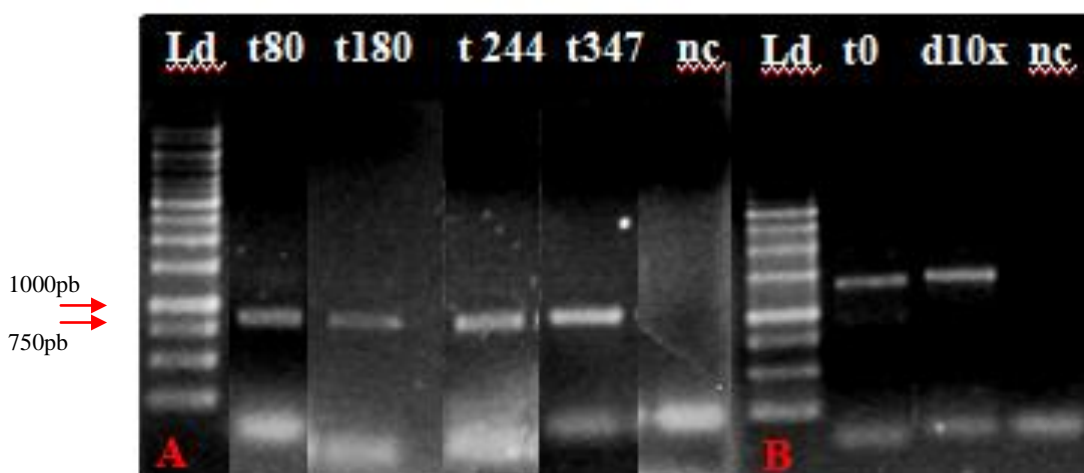


Figura 5.16 – (A) Detecção pela PCR do DNAr 16S de anammox com iniciadores Pla46F e Amx820R. Ld é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t80) Amostra de DNA extraída da biomassa enriquecida após 80 dias de cultivo, (t180) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 180 dias de cultivo, (t244) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 244 dias, (t347) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 347 dias.

(B) Detecção pela PCR do DNAr 16S de Planctomicetos com iniciadores Pla46F e Eub1392R. (t0) DNA extraído do lodo ativado utilizado como inóculo (DNA concentrado), (d10x) Amostra de DNA diluída 10 vezes extraída do Lodo ativado, nc é o controle negativo da reação

5.3.3 Detecção das bactérias nitrificantes pela técnica da PCR

Com o intuito de investigar a coexistência de bactérias nitrificantes e anammox, nesse segundo experimento, foram realizadas reações da PCR com iniciadores específicos para as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia e oxidadoras de nitrito.

Os resultados demonstraram a presença do gene *amoA* (que codifica para a enzima amônia monooxigenase), com bandas bastante nítidas, indicando presença das oxidadoras de amônia no lodo enriquecido no RBS após 80, 160, 180, 202, 223, 244 e 347 dias de cultivo (Figura 5.17). Esses resultados indicam que no experimento II as bactérias oxidadoras aeróbias de amônia permaneceram presentes no RBS e co-existiram com as bactérias anammox, o que também pode indicar que a anaerobiose do sistema não foi completa, ou que as oxidadoras aeróbias da amônia se adaptaram à condição anóxica. Tal fato já foi relatado na literatura, ou seja, espécies de bactérias oxidadoras aeróbias de amônia, tais como *Nitrosomonas eutropha* e *Nitrosomonas europaea*, foram descritas como organismos capazes de sobreviver em condições anóxicas (SCHMIDT *et al.*, 2002).

Esses resultados são suportados pela literatura, uma vez que, estudos recentes têm investigado a coexistência das bactérias aeróbias oxidadoras de amônia e nitrito com as bactérias anammox. Schmidt *et al.* (2002) sugeriram que em vários ecossistemas *Candidatus B. anammoxidans* é dependente da atividade de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia, sob condições limitantes de oxigênio. Esse fato foi constatado na interface aeróbia/anóxica da biomassa em estações de tratamento de águas residuárias na Holanda, Alemanha, Suíça, Reino Unido, Austrália e Japão (JETTEN, 2001 *apud* SCHMIDT *et al.*, 2002). Os ambientes que apresentam interfaces aeróbia/anóxica são abundantes na natureza, por exemplo, em biofilmes e flocos microbianos. Sendo assim, nesses locais onde o oxigênio é limitado as oxidadoras aeróbias de amônia oxidam o nitrogênio amoniacal a nitrito, mantendo a concentração de oxigênio baixa para as anammos, enquanto *Candidatus B. anammoxidans* converte o nitrito produzido e o restante do nitrogênio amoniacal em nitrogênio gasoso (SCHMIDT *et al.*, 2002).

Além disso, Park *et al.* (2010) também observaram a presença de oxidadoras aeróbias de amônia e oxidadoras de nitrito coexistindo com a população de bactérias anammox tanto em um RBS, com volume de 20 litros, quanto em outro reator, com volume de 4 litros, operado como reator CANON. Os autores observaram que em ambos os reatores foi detectada a presença tanto de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia quanto de nitrito. Para o caso específico das bactérias aeróbias oxidadoras de amônia foi observada que a estrutura da comunidade global nos dois reatores apresentou diferenças marcantes. O sistema CANON promoveu o crescimento de uma fração maior de oxidadoras aeróbias de amônia do que o reator granular, provavelmente por que no primeiro sistema ocorreu alternância de estágios

aeróbios e anóxicos. Além disso, nesse estudo populações distintas de oxidadoras aeróbias de amônia foram observadas. No reator granular inicialmente estavam presentes *Nitrosomonas eutropha*, posteriormente foi observada população de *Nitrosomonas europaea*. Já no sistema CANON a população manteve-se bastante consistente sendo formada apenas por *N. eutropha*.

Xiao *et al.* (2009) também verificaram a presença simultânea de bactérias anammox e de oxidadoras aeróbias de amônia e de nitrito. Eles estudaram a diversidade bacteriana presente em um RBS alimentado com lixiviado de aterro sanitário. Os resultados indicaram que a estrutura da comunidade do biofilme manteve-se estável durante todo o período de operação do reator, apresentando populações de anammox coexistindo com bactérias nitrificantes. Os autores concluíram que a presença simultânea de bactérias nitrificantes e de anammox resultou na alta eficiência de remoção da amônia.

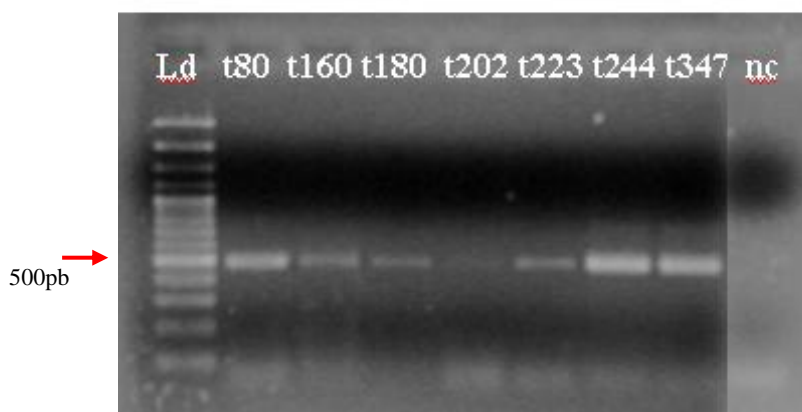


Figura 5.17 – Detecção pela PCR do gene *amoA* das bactérias aeróbias oxidadoras de amônia com iniciadores AmoA1F e AmoA2R. Ld é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t80) Amostra de DNA extraída da biomassa enriquecida após 80 dias de cultivo, (t160) Amostra de DNA da biomassa após 160 dias de cultivo, (t181) Amostra de DNA da biomassa após 181 dias, (t202) Amostra de DNA da biomassa após 202 dias, (t223) Amostra de DNA da biomassa após 223 dias, (t244) Amostra de DNA da biomassa após 244 dias, (t347) Amostra de DNA da biomassa após 347 dias, nc é o controle negativo da reação. A seta indica o produto de PCR com 500pb que é o fragmento de tamanho correto amplificado pelos iniciadores

Em contrapartida, foi avaliada também a presença de bactérias nitrificantes oxidadoras de nitrito, utilizando três pares de iniciadores específicos. Os resultados demonstraram não haver presença de DNAr 16S de bactérias oxidadoras de nitrito no lodo do RBS após 80, 160, 181,

202, 223, 244, 270 e 347 dias de cultivo quando foi utilizado o par de iniciadores FGPS872R e FGPS1269F, os quais são específicos para parte do gene RNAr 16S de *Nitrobacter* sp.. Sendo assim, optou-se por testar outro par de iniciadores, NxrB-1R e NxrB-1F, que é específico para o gene da *Nitrito oxidoreductase* (subunidade *Beta-nxrB*) de *Nitrobacter*. Os resultados para esse segundo par de iniciadores foram positivos para as amostras de DNA do lodo enriquecido após 160, 244 e 247 dias de cultivo, e o controle negativo não apresentou amplificação (Figura 5.18). Portanto, esses resultados sugerem que bactérias oxidadoras de nitrito, do gênero *Nitrobacter*, estavam presentes na biomassa enriquecida no RBS no experimento II.

O terceiro par de iniciadores utilizado foi o NSR1113F e NSR1246R, específico para parte do gene RNAr 16S de *Nitrospira* sp., com o intuito de verificar a presença de bactérias oxidadoras aeróbias de nitrito deste respectivo gênero. Os resultados foram positivos para as amostras de DNA do lodo enriquecido após 80, 180, 202, 223, 244 e 347 dias de cultivo, e o controle negativo não apresentou amplificação (Figura 5.19). Portanto, indicando a presença de bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito, do gênero *Nitrospira*, na biomassa enriquecida no experimento II, além daquelas do gênero *Nitrobacter*, citadas anteriormente.

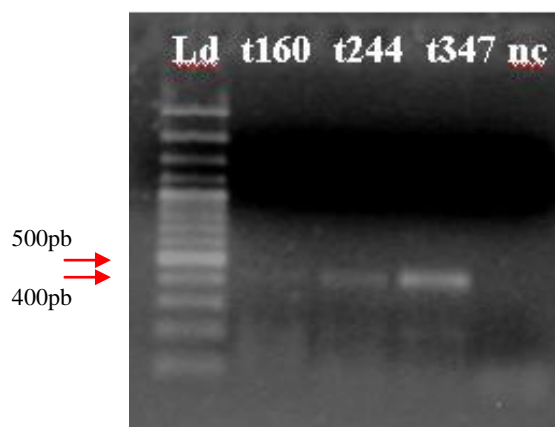


Figura 5.18 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de bactérias oxidadoras aeróbias de nitrito (*Nitrobacter*) com iniciadores NxrB1F e NxrB1R. Ld é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t160) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 160 dias de cultivo, (t244) Amostra de DNA da biomassa após 244 dias e (t347) Amostra de DNA da biomassa após 347 dias, nc é o controle negativo da reação

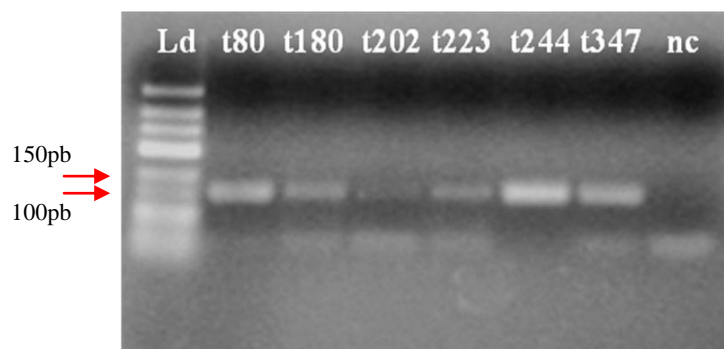


Figura 5.19 – Detecção pela PCR do DNAr 16S de bactérias oxidadoras aeróbias de nitrito (*Nitrospira*) com iniciadores NSR1113F e NSR1246R. Ld é o marcador de peso molecular (1Kb - Fermentas), (t80) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 80 dias de cultivo, (t180) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 180 dias de cultivo, (t202) Amostra de DNA da biomassa após 202 dias de cultivo, (t223) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 223 dias de cultivo, (t244) Amostra de DNA da biomassa após 244 dias, (t347) Amostra de DNA da biomassa enriquecida após 347 dias de cultivo e nc é o controle negativo da reação

Alguns trabalhos na literatura sugerem que aparentemente, as oxidadoras aeróbias de nitrito são incapazes de competir pelo oxigênio, com as oxidadoras aeróbias de amônia, e pelo nitrito, com as bactérias anammox. Segundo Schmidt *et al.*(2002), parece provável que em condições limitantes de oxigênio as bactérias oxidadoras de amônia aeróbias e anaeróbias formem uma comunidade bastante estável, impedindo o estabelecimento de populações de oxidadoras de nitrito. Entretanto, os resultados encontrados neste trabalho, sugerindo a presença de oxidadoras aeróbias de nitrito coexistindo com bactérias anammox e oxidadoras aeróbias de amônia, são suportados por outros dados da literatura.

Park *et al.* (2010) também observaram, além de oxidadoras aeróbias de amônia e de bactérias anammox, a presença de oxidadoras aeróbias de nitrito tanto em um RBS, com volume de 20 litros, quanto em outro reator, com o volume de quatro litros, operado como reator CANON. Para o caso específico das bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito foi observada que no reator CANON houve uma prevalência de *Nitrobacter* em relação à *Nitrospira*. Os autores sugeriram que isso deve ter ocorrido em função da alta carga afluyente de amônia no reator, que por sua vez, resultou em concentrações altas de nitrogênio nitroso no mesmo. Sendo assim, acredita-se que bactérias do gênero *Nitrobacter* apresentem vantagem seletiva em relação a bactérias do gênero *Nitrospira* quando expostas a grandes quantidades de nitrito.

Assim, em reatores de nitrificação parcial, como é o caso do sistema CANON, ocorre uma prevalência de *Nitrobacter* sobre *Nitrospira*. Entretanto, em reatores inoculados com Lodos Ativados, como foi o caso do presente trabalho, bactérias do gênero *Nitrospira* devem prevalecer sobre bactérias do gênero *Nitrobacter* (BURRELL *et al.*, 1998; DAIMS *et al.*, 2001; DIONISI *et al.*, 2002; GIESEKE *et al.*, 2005; JURETSCHKO *et al.*, 1998). No presente trabalho as bactérias do gênero *Nitrospira*, foram encontradas em um número bem maior de amostras do que aquelas do gênero *Nitrobacter*. Sendo assim, a prevalência de *Nitrospira* em detrimento de *Nitrobacter*, coexistindo com oxidadoras aeróbias de amônia e bactérias anammox na biomassa enriquecida no experimento II, são dados suportados pela literatura.

Xiao *et al.* (2009) também verificaram a coexistência de bactérias anammox com bactérias aeróbias oxidadoras de amônia e de nitrito. No caso das últimas, foram encontradas quatro espécies distintas: *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrobacter alkalicus*, *Nitrospina gracilis* e *Nitrospira sp.*. A partir desses resultados, os referidos autores sugeriram que a produção de nitrito por parte da comunidade bacteriana de oxidadoras aeróbias de amônia forneceu o substrato necessário para ocasionar essa diversidade de bactérias oxidadoras de nitrito. Portanto, os trabalhos de Park *et al.* (2010) e Xiao *et al.* (2009) corroboram os resultados encontrados no presente trabalho com relação a coexistência de bactérias anammox, oxidadoras aeróbias de amônia e oxidadoras aeróbias de nitrito na biomassa enriquecida no experimento II.

5.3.4 Detecção e quantificação das bactérias Anammox e das nitrificantes pela técnica de FISH

As análises de FISH, não revelaram a presença de bactérias anammox no lodo de inóculo, indicando que elas poderiam estar presentes, mas em concentração muito baixa, inferior ao limite de detecção da técnica, que é cerca de 10^3 a 10^4 células/ml (AMANN *et al.*, 1995). Entretanto, os resultados com amostras da biomassa enriquecida no RBS após 80, 160, 202, 244 e 270 dias de cultivo, revelaram a presença de anammox, que hibridaram com as sondas Amx820 e Amx1240. A figura 5.20 apresenta exemplos dos resultados positivos obtidos na hibridação com as sondas Amx820 (após 160 dias de cultivo) e Amx1240 (após 80, 202 e 244 dias de cultivo), confirmando o enriquecimento das anammox. Conforme descrito previamente para *Candidatus B. anammoxidans* (STROUS, 2000), as células de anammox enriquecidas no presente trabalho apresentaram morfologia arredondada, e uma região escura (quase sem fluorescência) no centro da célula. Esta área central, ausente de ribossomos e de

DNA (pois não corou com DAPI), deve ser presumivelmente a região rica em proteína similar ao anammoxossomo de *B. anammoxidans*.

Foram realizadas também análises de FISH, com sondas específicas para as bactérias nitrificantes, de modo a verificar se estas estariam coexistindo com as anammox na biomassa enriquecida. Os resultados sugeriram a presença de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia na biomassa cultivada no RBS após 80, 160, 180, 202, 223, 244 e 270 dias de operação. A figura 5.21 apresenta os resultados da hibridação com a sonda Nso190, específica para oxidadoras de amônia do gênero *Nitrosomonas*, da biomassa retirada do reator após 244 dias de cultivo.

Em relação às oxidadoras aeróbias de nitrito, não foram detectadas células do gênero *Nitrobacter*, uma vez que as hibridações com a sonda NIT3 foram todas negativas. Não obstante, foram detectadas células de *Nitrospira* que apresentaram sinal com a sonda Ntspa662 nas amostras retiradas do RBS após 80, 160, 180, 202, 223, 244 e 270 dias de operação. A figura 5.22 apresenta um exemplo do resultado positivo obtido da hibridação com a sonda Ntspa662 (específica para *Nitrospira*). Neste caso, as células de *Nitrospira* foram detectadas na biomassa do RBS após 160 dias de operação do reator. Os resultados das análises de FISH confirmaram, portanto, os resultados da PCR, e indicam a presença de oxidadoras de nitrito - *Nitrospira* coexistindo com bactérias anammox e bactérias aeróbias oxidadoras de amônia do gênero *Nitrosomonas*, conforme já relatado em outros trabalhos (XIAO *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2010).

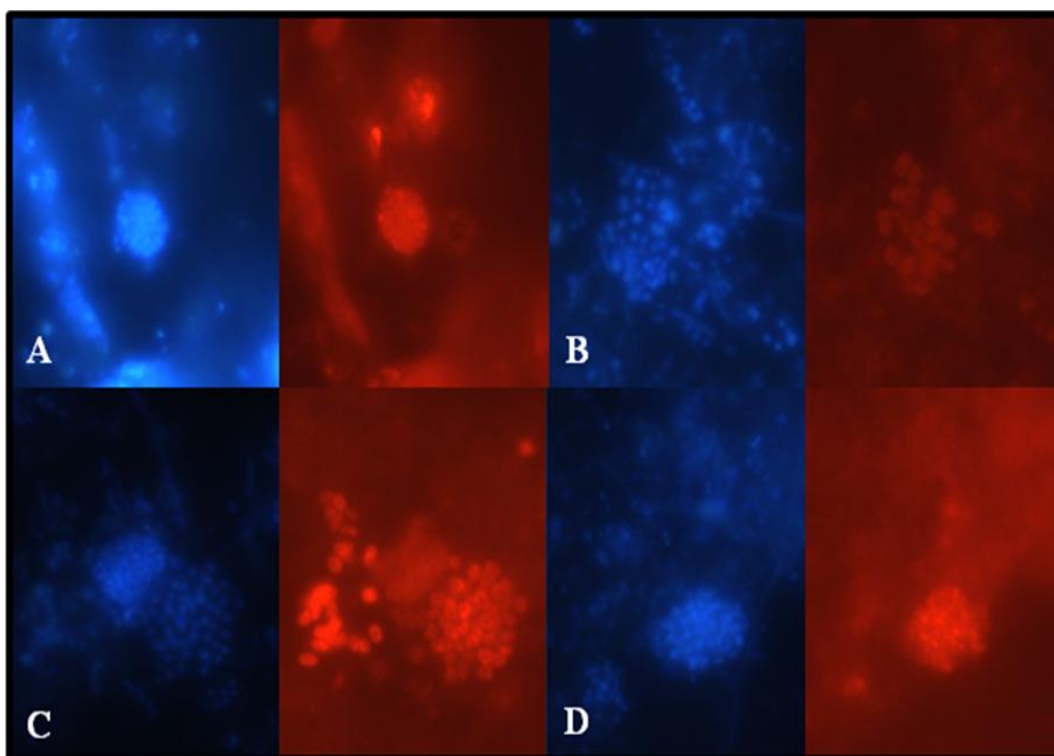


Figura 5.20: Análise de FISH da biomassa cultivada no RBS após 80 (A), 160 (B), 202 (C) e 244 (D) dias de enriquecimento. Células coradas com DAPI em azul e células hibridadas com a sonda em vermelho. Sonda Amx1240 (específica para *Ca. Brocadia*) em A, C e D e sonda Amx820 (específica para os gêneros *Ca. Brocadia* e *Ca. Kueneria*) em B

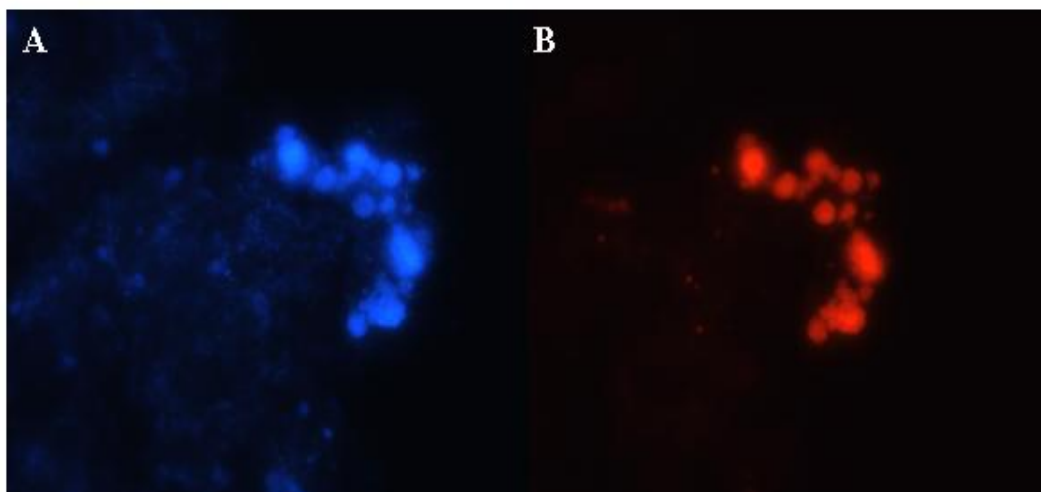


Figura 5.21: Análise de FISH da biomassa cultivada no RBS após 244 dias de enriquecimento. Células coradas com DAPI em azul (A) e células hibridadas com a sonda Nso190 (específica para a maioria das oxidadoras de amônia da Subclasse β -*Proteobacteria*, inclusive *Nitrosomonas*) em vermelho (B)

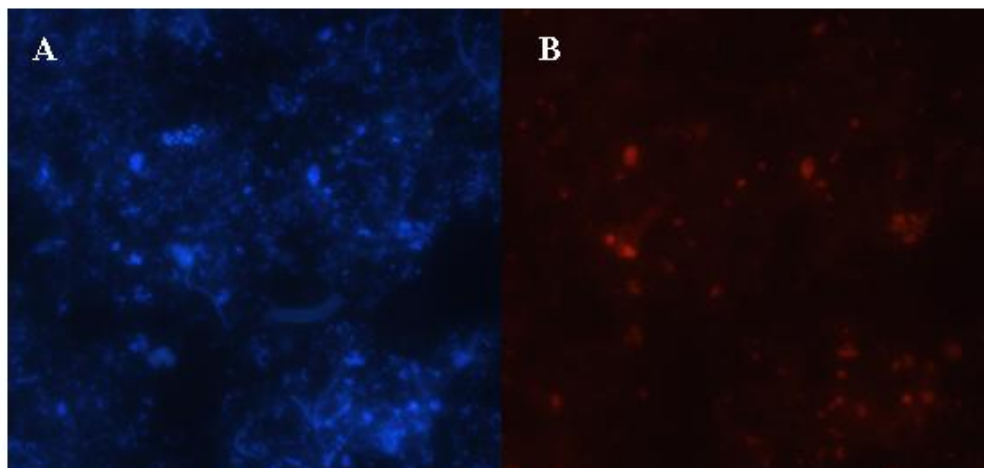


Figura 5.22: Análise de FISH da biomassa cultivada no RBS após 160 dias de enriquecimento. Células coradas com DAPI em azul (A) e células hibridadas com a sonda Ntspa662 (específica para *Nitrospira*) em vermelho (B)

A quantificação das bactérias anammox e bactérias nitrificantes, em relação ao número total de células (coradas com DAPI), para os tempos de 80, 160, 202, 244 e 270 dias de operação do reator foi realizada em duplicata. Onde, em cada pocinho da lâmina, foram contados 6 campos. São apresentados na Tabela 5.2 e na Figura 5.23 as médias das duplicatas e o respectivo desvio-padrão para cada uma delas. Esses resultados sugerem que as bactérias anammox constituíram a população dominante ao longo do período de enriquecimento (variando de 32% à 48% em relação ao total de células), tanto quando se considera as contagens realizadas com a sonda Amx-820, específica para os gêneros *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia*, quanto àquelas com a sonda Amx-1240, com especificidade para *Ca. Brocadia* (SCHMID *et al.*, 2000). Não obstante, essa população aumentou consideravelmente de 32%, na fase de propagação (tempo de 80 dias) para 37%, 48% e 44% na fase anammox, nos respectivos tempos de 160, 202 e 244 dias, quando se considera as contagens com a sonda Amx-820 (Tabela 5.2 e Figura 5.23). Já ao final da fase anammox e durante a fase de declínio (tempo de 270 dias) ocorreu uma redução da porcentagem de células hibridadas, de 44% para 26% (sonda Amx-820) sugerindo que a redução na eficiência de remoção de amônia e nitrito pode ter sido ocasionada pela diminuição na população de anammox.

Quando se considera as células hibridadas com a sonda Amx-1240 constatou-se uma tendência de redução da população de *Ca. Brocadia*, sendo que esta apresentou maior valor durante a fase de propagação, 45,5% em relação ao total de células, (tempo de 80 dias), diminuindo progressivamente ao longo da fase anammox para 38%, 33%, 32%,

respectivamente nos tempos de 160, 202 e 244 dias, e, posteriormente atingiu 23% no tempo de 270 dias (considerado a fase de declínio de atividade).

A partir de 202 dias *Kuenenia* deve ter sido detectada na biomassa enriquecida simultaneamente com *Brocadia*, o que explicaria a diferença observada entre as porcentagens obtidas com as duas sondas (Amx820 e Amx1240), 15%, 12%, e 4%, respectivamente para os tempos de 202, 244 e 270 dias. Como os valores foram maiores para a sonda Amx820, nesses respectivos tempos, isso poderia implicar que células do gênero *Kuenenia* passaram a ser detectadas na amostra nos respectivos tempos analisados, mas *Kuenenia* não chegou a ser dominante (muito pelo contrário a porcentagem de células desse gênero detectadas diminuiu), bem como não houve uma sucessão populacional entre esses dois gêneros. *Brocadia* ainda se manteve dominante como população anammox no reator. Não obstante, esses dados necessitam ainda de confirmação, e espera-se que os resultados da clonagem e sequenciamento dessas amostras nos diferentes tempos possam ajudar a elucidar melhor essa questão.

Fato semelhante, de ocorrência simultânea (e temporária) de *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia* no mesmo reator, foi relatado previamente na literatura (VAN DER STAR *et al.*, 2008). Esses autores enriqueceram bactérias anammox em um biorreator de membrana (BRM), utilizando como inóculo lodo granular anammox e observaram alteração da população ao longo do tempo de operação do reator. O lodo passou de granular para floculento por volta dos 60 a 65 dias de operação, ao mesmo tempo em que se observou mudança da população anammox. A população inicial que era de *Ca. Brocadia*, manteve-se assim até cerca de 35 dias, mas por volta do 64^o dia de operação, a população passou a ser constituída por uma mistura de *Ca. Brocadia* e *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*. A partir dos 149 dias de operação a população tornou-se majoritariamente formada por *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*, indicando a ocorrência da sucessão populacional entre as bactérias anammox.

Van der Star *et al.* (2008) afirmaram que a prevalência de *Ca. Kuenenia* não ocorreu com base na taxa de crescimento. A hipótese mais aceita, nesse caso, foi de que a seleção positiva para *Ca. Kuenenia*, neste reator, se baseou na sua afinidade para com o substrato limitante, neste caso o nitrito. Em outros enriquecimentos em escala de bancada (sem adição extra de ácidos, ou sais) utilizando o RBS a cultura, geralmente, tem predominância de *Ca. Kuenenia*, também nestes casos, a afinidade para nitrito pode ser o fator determinante (VAN DER STAR

et al., 2008). Com base nessas observações, os autores sugeriram a hipótese de que *Ca. Kuenenia* deve ser um microrganismo “k” estrategista, baseada na afinidade pelo substrato limitante, enquanto que *Ca. Brocadia* deve ser “r” estrategista, baseando-se na taxa de crescimento. Porém, os autores afirmaram que as afinidades pelo substrato limitante entre os dois grupos ainda não foram avaliadas com precisão suficiente para comprovar esta hipótese, portanto, são necessários ainda mais estudos.

Tabela 5.2 – Porcentagem de células hibridadas na biomassa do RBS para os diferentes grupos bacterianos analisados em relação ao total de células coradas com DAPI

Tempo	<i>Nitrosomonas</i> (Nso190)	<i>Nitrospira</i> (Ntspa662)	<i>Nitrobacter</i> (NIT3)	Anammox (Amx-820)	Anammox (Amx-1240)
80 dias	15,06 [*] (± 2,31) ^{**}	19,25 (± 1,41)	0,00 (± 0,00)	34,88 (± 0,14)	45,52 (± 6,62)
160 dias	14,99 (± 0,11)	27,55 (± 2,74)	0,00 (± 0,00)	37,41 (± 3,47)	38,14 (± 19,23)
202 dias	24,77 (± 0,69)	35,14 (± 7,00)	0,00 (± 0,00)	48,59 (± 9,57)	33,34 (± 6,41)
244 dias	20,17 (± 5,51)	27,83 (± 1,88)	0,00 (± 0,00)	44,19 (± 5,20)	32,52 (± 4,64)
270 dias	18,70 (± 5,33)	19,55 (± 1,62)	0,00 (± 0,00)	26,64 (± 10,44)	22,82 (± 1,24)

*Média da duplicata **Desvio Padrão

Park *et al.* (2010) também observaram alteração na composição da população de bactérias anammox cultivadas em um RBS inoculado com lodo granular anammox. Os autores observaram uma sucessão populacional ao longo do tempo de operação do reator. No inóculo original a população principal de bactérias anammox era constituída por *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*. Já durante o pré – enriquecimento a população passou a ser constituída por *Ca. Brocadia fulgida* (antes da operação do RBS). Por fim, durante a operação, a população foi substituída novamente, passando a ser constituída por membros relacionados à *Ca. Brocadia* sp. 40. Sendo assim, os referidos autores sugeriram que a composição do inóculo e as concentrações de substrato existentes nos reatores podem desempenhar papel importante na seleção da população bacteriana que irá se desenvolver, porém essa seleção não é equivalente para todos os grupos de bactérias anammox no ambiente complexo dos reatores.

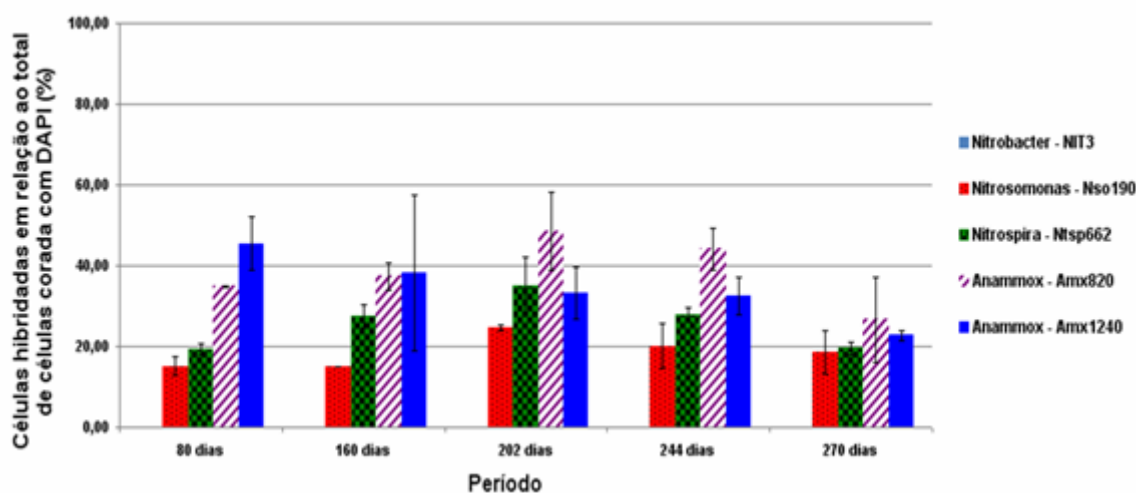


Figura 5.23: Diversidade Microbiana da biomassa desenvolvida no RBS ao longo do tempo, para os grupos bacterianos analisados pelo FISH com as respectivas sondas: *Nitrobacter* (sonda Nit3), *Nitrosomonas* (sonda Nso190), *Nitrospira* (sonda Ntspa662), Anammox (gêneros *Brocadia* e *Kuenenia*- sonda Amx820), Anammox (gênero *Brocadia* - sonda Amx1240).

Da mesma forma, Kartal *et al.* (2007) descreveram uma nova espécie de bactéria anammox, com um nicho bem definido: a co-oxidação de propionato além do nitrogênio amoniacal. Essa nova espécie anammox foi enriquecida em um biorreator em escala de laboratório, na presença de amônio e propionato. Ela foi denominada *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*, e substituiu a população de *Ca. Brocadia anammoxidans* ao longo do período de enriquecimento, à medida que o propionato foi adicionado, indicando que a sucessão de espécies entre as bactérias anammox ocorre comumente durante o enriquecimento.

Em relação às bactérias aeróbias oxidadoras de amônia hibridadas com a sonda Nso190, específica para muitas oxidadoras de amônia da Subclasse β -*Proteobacteria*, inclusive *Nitrosomonas*, os resultados indicaram que esta população manteve-se relativamente estável ao longo do enriquecimento (cerca de 15 a 25% do total de células). Sua prevalência foi relativamente menor, quando comparado aos outros grupos bacterianos estudados. Não obstante, apesar de presente em menor proporção houve aumento desta população, de 15% (na fase de propagação - 80 dias) para cerca de 25%, na metade da fase anammox (202 dias). Em seguida, houve uma redução populacional no final da fase anammox (244 dias) que se seguiu até a fase de declínio (270 dias) (Figura 5.23).

No que se refere às bactérias oxidadoras de nitrito do gênero *Nitrobacter*, os resultados do FISH (com a sonda NIT3) foram negativos sugerindo que esta população não estava presente, ou, poderia estar abaixo do limite de detecção da técnica (10^3 a 10^4 células/ml). Não obstante os resultados da PCR com iniciadores para o gene da enzima *Nitrito oxidoreductase* de *Nitrobacter* foram positivos para amostras coletadas em três tempos de cultivo (160, 244 e 347 dias), indicando portanto presença de *Nitrobacter* no reator. Já em relação às bactérias oxidadoras de nitrito do gênero *Nitrospira* (hibridadas com a sonda Ntspa662), os resultados indicaram que esta população estava presente na biomassa cultivada no RBS (conforme resultados apresentados na Figura 5.23).

A proporção desta população aumentou progressivamente ao longo do enriquecimento de 19% (na fase de propagação - 80 dias) para 25,7% e 35%, respectivamente, na fase anammox nos tempos de 160 e 202 dias. Posteriormente apresentou redução para 27,8% no final da fase anammox (244 dias), a qual se acentuou (foi para 19,5%) na fase de declínio (270 dias) (Tabela 5.2 e Figura 5.23). Além disso, sua prevalência foi maior em comparação aos outros dois grupos de bactéria nitrificantes investigados. Esses resultados também são suportados pela literatura, principalmente pelos trabalhos de Park *et al.* (2010) e Xiao *et al.* (2009) já discutidos anteriormente no que se refere à coexistência de bactérias anammox, oxidadoras aeróbias de amônia e oxidadoras aeróbias de nitrito em uma mesma biomassa enriquecida.

5.4 Comparação dos resultados obtidos nos experimentos I e II

A tabela 5.3 apresenta um resumo comparativo dos resultados obtidos nos dois experimentos realizados para promover o enriquecimento de bactérias anammox, a partir de amostra de lodo ativado.

Tabela 5.3 – Resumo dos resultados obtidos na operação do RBS para os experimentos I e II realizados para o enriquecimento de bactérias anammox

Estratégia adotada e características analisadas	Experimento I	Experimento II
Volume de inóculo	650 mL	1500 mL
Concentração de STV	2,6 g/L	6,9 g/L
Tempo do experimento	420 dias	420 dias
Concentração inicial de NH₄ e NO₂	30 e 30 mg/L	32 e 46 mg/L
Relação estequiométrica de NH₄/NO₂	1:1	1:1,26
Tempo em que se iniciou o aumento da concentração afluyente de NH₄ e de NO₂	Após 90 dias, início da fase III-Anammox	Após 170 dias, na metade da fase III-Anammox
Duração da fase I- desnitrificação	25 dias	20 a 25 dias
Duração da fase II- propagação	70 a 75 dias	30 dias
Início de atividade anammox	No 87º dia	No 50º dia
Eficiência de remoção de N-NH₄ e N-NO₂ na fase II- propagação	Amônia de 10 a 50%, nitrito de 10 a 30%	Amônia de 40 a 50%, nitrito de 60 a 80%
Eficiência de remoção de N-NH₄ e N-NO₂ no início da fase III-anammox	Amônia 70%, nitrito 60%	Amônia 40 a 60%, nitrito 60%
Eficiência de remoção de N-NH₄ e N-NO₂ no final da fase III- anammox e concentração de N (N-NH₄ + N-NO₂) removida	90 a 100% (com 180 dias), ou seja, remoção de 173 mg/L de N (N-NH ₄ + N-NO ₂)	70% (até 250 dias), ou seja, remoção de 77 mg/L de N (N-NH ₄ + N-NO ₂)

Deteção e quantificação das bactérias anammox através do FISH (sonda Amx1240)	Positivo – 53% em relação ao total de células após 180 dias	Positivo - porcentagem variou de 45%, 36% a 23%, após 80, 202 e 270 dias, respectivamente
Deteção de bactérias nitrificantes através do FISH com sondas para <i>Nitrosomonas</i> (Nso190), <i>Nitrobacter</i> (NIT3) e <i>Nitrospira</i> (Ntspa662)	Negativo para as três sondas testadas	Negativo para <i>Nitrobacter</i> ; positivo para <i>Nitrosomonas</i> e <i>Nitrospira</i>
Deteção das anammox por PCR	Positivo em todas as amostras analisadas ao longo do tempo	Positivo em todas as amostras analisadas ao longo do tempo
Deteção das oxidadoras aeróbias de amônia por PCR	Não foi realizado	Positivo em todas as amostras analisadas ao longo do tempo
Deteção das oxidadoras de nitrito por PCR	Não foi realizado	Positivo em todas as amostras analisadas ao longo do tempo
Identificação filogenética da biomassa anammox enriquecida	A maioria dos clones apresentou similaridade > 99% com <i>Ca. Brocadia sinica</i> ; 1 clone pode ser uma espécie nova, provisoriamente denominada de <i>Ca. Brocadia brasiliensis</i>	Análise em andamento no Laboratório de Saúde Pública da USP

A partir dos resultados obtidos é possível perceber que a atividade anammox foi obtida mais precocemente no experimento II quando comparado ao experimento I. Provavelmente, isso ocorreu devido a utilização de maior quantidade de inóculo no segundo experimento. Consequentemente, maior quantidade de bactérias anammox estava presente no inóculo do experimento II, o que pode ser confirmado pela duração da fase de propagação que foi de 30 dias neste experimento, quando comparado aos 75 dias no experimento I. Além disso, logo no início do experimento II (na fase II de propagação) verificou-se valores mais altos de eficiência de remoção de amônia e de nitrito, quando comparado ao experimento I. Não obstante, os valores máximos de eficiência de remoção de amônia e de nitrito alcançados durante a fase anammox (fase III) foram menores no experimento II, em relação ao experimento I.

Com relação a biomassa enriquecida, pode-se verificar que houve diferença marcante entre os dois experimentos. Enquanto que no experimento I não foram detectadas bactérias nitrificantes (oxidadoras de amônia e de nitrito) coexistindo com as bactérias anammox, no

experimento II estas foram detectadas e quantificadas através da técnica de FISH em diferentes tempos ao longo do enriquecimento. Assim, verificou-se que provavelmente *Nitrosomonas* e *Nitrospira* estavam coexistindo com células anammox (provavelmente dos gêneros *Brocadia* e *Kuenenia*) na biomassa enriquecida do experimento II. Acredita-se que este fato também tenha sido decorrente da utilização de um volume maior de inóculo, associado às baixas concentrações de amônia e de nitrito (no meio afluente) que foram mantidas por mais tempo no experimento II em comparação ao I.

Provavelmente, a maior população de nitrificantes do inóculo II foi mais bem sucedida na resistência às condições seletivas do cultivo das bactérias anammox, ou ainda, a anaerobiose do sistema no experimento II pode não ter sido tão eficiente quanto no experimento I, apesar de ter garantido o enriquecimento das bactérias anammox. Sendo assim, a presença de uma população considerável de bactérias nitrificantes (dentre outras que não foram analisadas) na biomassa do experimento II pode ter ocasionado uma menor eficiência de remoção de amônia e nitrito em comparação às eficiências de remoção obtidas no experimento I, as quais foram superiores. Isso porque a coexistência das bactérias aeróbias oxidadoras de amônia e de nitrito com as anammox implicou em competição pelos substratos comuns (amônia e nitrito) entre essas populações, o que se refletiu nos menores valores de eficiência de remoção desses compostos nitrogenados, observados no experimento II.

Com relação ao experimento I, verificou-se que a população de anammox enriquecida pertencia ao gênero *Brocadia* e a identificação filogenética dos clones obtidos revelou que a maioria deles eram semelhantes à *Ca. Brocadia sinica* (com 99% de similaridade). Não obstante, verificou-se que 1 clone (representando uma população minoritária de anammox) embora estivesse relacionado com as sequências de *Ca. Brocadia fulgida* e *Ca. Brocadia sp. 40*, pode representar uma nova espécie de anammox, denominada provisoriamente de *Candidatus Brocadia brasiliensis*. Assim, no experimento I foi possível enriquecer simultaneamente duas espécies distintas de anammox, fato esse que não é comum e foi pouquíssimo reportado na literatura.

Com relação a abundância das bactérias anammox obtida, pode-se verificar que as características do experimento I (no que se refere ao volume de inóculo usado, aumento gradativo e mais rápido, das concentrações de amônia e nitrito afluente) permitiram obter uma população maior de bactérias anammox (cerca de 53% em relação ao total de células) no lodo

enriquecido quando comparado ao experimento II (cerca de 25 a 38% em relação ao total de células). Da mesma forma a estratégia adotada no experimento II (ou seja, utilização de quantidade maior de inóculo bem como manutenção de concentrações baixas de amônia e nitrito por mais tempo, quando comparado ao experimento I), deve ter contribuído para a obtenção desses resultados, principalmente quando se considera que a operação do sistema em termos de temperatura, ciclos de batelada sequencial, condições de anaerobiose, manutenção de pH foram as mesmas em ambos os experimentos.

6 CONCLUSÕES

A presente pesquisa teve por objetivo cultivar e aumentar a população de bactérias anammox a partir de lodo aeróbio proveniente de um Sistema de Lodos Ativados, e posteriormente caracterizar, por meio de técnicas de biologia molecular, a biomassa enriquecida no reator ao longo do tempo de operação. A partir do que foi exposto anteriormente conclui-se que o lodo aeróbio oriundo de um sistema de lodos ativados tratando esgotos domésticos foi um inóculo adequado para se obter e enriquecer as bactérias anammox em dois experimentos distintos, apesar de não possuir previamente atividade anammox.

No experimento I, esse lodo desenvolveu atividade anammox após 90 dias de cultivo em meio autotrófico e anaeróbio em RBS com TDH de 24 horas. O choque de carga ocorrido no RBS após cerca de 210 dias de operação levou a eliminação de parte da população anammox, reduzindo a eficiência de remoção de nitrito e amônia. A presença das anammox foi confirmada através da técnica de FISH, indicando que eram bactérias do gênero *Brocadia*. A identificação filogenética dos clones obtidos revelou que houve enriquecimento simultâneo de duas espécies distintas de anammox, *Ca. Brocadia sinica* (representando a maioria dos clones analisados) e *Candidatus Brocadia brasiliensis* (representando uma população minoritária, já que somente 1 clone apresentou esta sequência). Esta segunda espécie embora esteja relacionada com as sequências de *Ca. Brocadia fulgida* e *Ca. Brocadia sp. 40*, deve representar uma nova espécie de anammox, para a qual sugerimos provisoriamente o nome de *Ca. Brocadia brasiliensis*. Assim, no experimento I foi possível enriquecer simultaneamente duas espécies distintas de anammox.

No segundo experimento o mesmo lodo desenvolveu atividade anammox após 50 dias de cultivo em meio autotrófico e anaeróbio em RBS com TDH de 24 horas. A utilização de um volume maior de inóculo contribuiu para que a atividade anammox aparecesse mais cedo neste cultivo, quando comparado ao experimento I. Não obstante, os valores de eficiência de remoção de amônia e de nitrito alcançados no experimento II foram menores em relação ao experimento I. Os resultados da PCR indicaram presença de bactérias anammox no lodo de inóculo e em quatro tempos distintos ao longo da operação do reator. Foram detectadas também, bactérias nitrificantes dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* e *Nitrospira* coexistindo com as bactérias anammox. A presença e quantificação das anammox e das bactérias nitrificantes dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira* foi confirmada e realizada

através do FISH em cinco amostras coletadas em tempos distintos ao longo do enriquecimento. Os dados confirmaram que houve coexistência (e competição) desses três grupos de bactérias na biomassa enriquecida e no caso das anammox, sugeriram que, provavelmente, houve enriquecimento simultâneo de dois gêneros distintos de anammox (*Brocadia* e *Kuenenia*).

Portanto, a utilização de um volume maior de inóculo no experimento II, em comparação ao experimento I, acarretou no desenvolvimento e detecção de atividade anammox em um tempo menor, uma vez que reduziu a duração da fase de propagação. Em contrapartida, esse maior volume de inóculo promoveu o desenvolvimento bem sucedido de bactérias nitrificantes em coexistência com as bactérias anammox, acarretando, provavelmente, competição pelos substratos, o que se refletiu em uma menor eficiência de remoção de amônia e nitrito quando comparado com o experimento I.

Os diferentes resultados obtidos entre os dois experimentos, no que se refere aos gêneros (e espécies) de anammox obtidas, bem como a presença ou não de nitrificantes (oxidadoras de amônia e de nitrito) na comunidade microbiana desenvolvida, se deveu ao modo (e estratégia) de operação adotada (em termos de concentração afluyente dos compostos nitrogenados) em cada um dos experimentos, uma vez que tanto o inóculo quanto o reator utilizado foram os mesmos. Portanto, pode-se concluir que um único inóculo deve conter uma enorme diversidade de bactérias anammox (bem como de outros grupos, como nitrificantes, por exemplo), mas a forma como elas serão selecionadas e enriquecidas e qual gênero ou espécie prevalecerá, dependerá muito das condições de operação dos sistemas e das estratégias adotadas ao longo do experimento.

7 RECOMENDAÇÕES

A partir da avaliação dos resultados obtidos no presente trabalho recomenda-se:

- Operar o RBS aumentando gradativamente as concentrações de amônia e de nitrito, bem como testando diferentes TDH, para desenvolver uma população maior de bactérias anammox, capaz de crescer e suportar concentrações altas de nitrogênio.
- Testar a utilização dessa cultura para o tratamento de efluentes contendo altas concentrações de nitrogênio amoniacal.
- Investigar, por meio de técnicas de biologia molecular, outros gêneros de bactérias nitrificantes que coexistem com bactérias anammox cultivadas em RBS.
- Investigar, por meio de técnicas de biologia molecular, a presença de bactérias desnitrificantes que podem estar coexistindo com bactérias anammox cultivadas em RBS.
- Investigar outros tipos de inóculos (lodos) para o enriquecimento de bactérias anammox em RBS, de modo a avaliar se a diversidade microbiana encontrada seria diferente ou semelhante àquela obtida neste estudo.
- Testar outras configurações de reatores (leito fixo, por exemplo) para o enriquecimento de anammox, de modo a verificar se seriam enriquecidas populações diferentes daquelas encontradas neste trabalho, caso fosse usado o mesmo inóculo (lodo ativado).

8 REFERÊNCIAS

ABREU, E. F. Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ALEXANDER, M. “Most probable number method for microbial populations”. In C. A. Black (ed.), *Methods of soil analysis*, part 2. Chemical and microbiological properties. pp. 1467 – 1472. American Society of Agronomy. Madison, Wis. 1982.

ALEXANDER, M.; CLARK, F. E. “Nitrifying bacteria”. In C. A. Black (ed.), *Methods of soil analysis*, part 2. Chemical and microbiological properties, pp. 1477 – 1483. American Society of Agronomy. Madison, Wis, 1982.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410, 1990.

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

APHA-American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed, Washington, DC, (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* 41: 12: 69-77, 2000.

ARAUJO, J. C., CHERNICHARO, C. A. L., Detection of Anaerobic Ammonium-oxidizing bacteria in different sludges and in a landfill leachate sample. Trabalho completo publicado nos anais do 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion 23-27 Setembro, Brisbane, Australia, 2007.

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

ARP, D. J., CHAIN, P. S.G., KLOTZ, M.G. The impact of genome analyses on our understanding of ammonia-oxidizing bacteria. *Ann Rev Microbiol* 61, 503–528, 2007.

ARRIGO K. R., Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437:349–355, 2005.

BAIRD, C. “Química Ambiental”. Porto Alegre : Bookman, 2002.

BANIHANI, Q., SUN, A., FIELD, J. A., SIERRA-ALVAREZ R. Enrichment of Anaerobic Ammonium Oxidizing (Anammox) Bacteria from Wastewater Sludge. *12th World Congress on Anaerobic Digestion (AD12)*, Guadalajara, México, 2010.

- BOTHE, H., FERGUSON, S. J., NEWTON, W. E. "Biology of the Nitrogen Cycle". Elsevier. 2007.
- BROCK, T. D. & MADIGAN, M.T.. "Biology of Microorganisms". New Jersey. Prentice Hall. 2005.
- BRODA, E. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17: 491-493, 1977.
- BURRELL, P.C., KELLER, J., BLACKALL, L.L. Microbiology of a nitriteoxidizing bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (5), 1878e1883, 1998.
- BYRNE, N., STROUS, M., CRÉPEAU, V., KARTAL, B., BIRRIEN, J. L., SCHMID, M., LESONGEUR, F., SCHOUTEN, S., JAESCHKE, A., JETTEN, M. S. M., PRIEUR, D., GODFROY, A. Presence and activity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *ISME J.* 3:117-123, 2009.
- CAMPOS, A. P. & ARAÚJO, J. C.. Relatório de Validação de Protocolo - Determinação de bactérias nitrificantes pelo método de Tubos Múltiplos (NMP). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 29 p. Protocolo da Rede PROSAB Microbiologia para o Saneamento Básico. Área: Bacteriologia. 2010. Disponível em: <<http://www.prosabmicrobiologia.org.br/rede/manuais>>.
- CAPONE DG, POPA R, FLOOD B, NEALSON KH. Follow the Nitrogen. *Science* 312, 708–709, 2006.
- CARMOUSE, G. P. Metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análise química. São Paulo: Edgard Brucher: Fapesp, 1994.
- CHAMCHOI, N. & NITISORAVUT, S. Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere* 66 (11), 2225–2232, 2007.
- CULLEN, D.W.; LEES, A.K.; TOTH, I.K.; DUNCAN, J.M., Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, v.107, p.387-398, 2001.
- DAIMS, H., NIELSEN, J.L., NIELSEN, P.H., SCHLEIFER, K.-H., WAGNER, M. *In-situ* characterization of nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (11), 5273e5284, 2001.
- DAIMS, H., NIELSEN, P., NIELSEN, J.L., JURETSCHKO, S., WAGNER, M., Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and *in situ* physiology. *Water Sci. Technol.* 41: 85-90, 2000.
- DALSGAARD, T., CANFIELD, D. E., PETERSEN, J., THAMDRUP, B., ACUNA-GONZALEZ, J. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* 422:606–608, 2003.

DAPENA-MORA, A., VAN HULLE, S.W.H., CAMPOS, J.L., MENDEZ, R., VAN ROLLEGHEM, P.A., JETTEN, M., Enrichment of anammox biomasa from municipal activated sludge: experimental and modeling results. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 79: 1421-1428, 2004.

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

DEGRANGE, V. & BARDIN, R. Detection and Counting of *Nitrobacter* Populations in Soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2093-2098, 1995.

DEVOL, A. H. Solution to a marine mystery. *Nature*, v. 422 , p. 575-576, abr. 2003.

DIJKMAN, H. & STROUS, M. Process for ammonium removal from wastewater PCT/NL99/00446, 1999.

DIONISI, H. M., LAYTON, A. C., HARMS, G., GREGORY, I. R., ROBINSON, K. G., and SAYLER, G. S. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 245–253, 2002.

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

DUCE, R. A., LAROCHE, J., ALTIERI, K., ARRIGO, K. R., BAKER, A. R., CAPONE, D. G., CORNELL, S., DENTENER, F., GALLOWAY, J., GANESHARAM, R. S., GEIDER, R. J., JICKELLS, T., KUYPERS, M. M., LANGLOIS, R., LISS, P. S., LIU, S. M., MIDDELBURG, J. J., MOORE, C. M., NICKOVIC, S., OSCHLIES, A., PEDERSEN, T., PROSPERO, J., SCHLITZER, R., SEITZINGER, S., SORENSEN, L. L., UEMATSU, M., ULLOA, O., VOSS, M., WARD, B., ZAMORA, L. Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean. *Science* 320, 893–897, 2008.

EGLI, K., FANGER, U., ALVAREZ, P.J.J., SIEGRIST, H., VAN DER MEER, J.R., ZEHNDER, A.J.B. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* 175: 198-207, 2001.

EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H-R.; ZEHNDER, A.J.B.; WAGNER, M.; VAN DER MEER, J.R. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3213-3222, 2003.

ESTEVEZ, F. de A. Fundamentos de limnologia. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 602 p., 1998.

FRANCIS, C. A.; BEMAN, J. M.; KUYPERS, M.M.M. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *Journal of the International Society for Microbial Ecology*, v. 1 , p. 19-27, 2007.

GALLOWAY, J. N., TOWNSEND, A. R., ERISMAN, J. W., BEKUNDA, M., CAI, Z. C., FRENEY, J. R., MARTINELLI, L. A., SEITZINGER, S. P., SUTTON, M. A. Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889–892, 2008.

GAUL, T., MAERKER, S., KUNST, S. Start-up of moving bed biofilm reactors for deammonification: The role of hydraulic retention time, alkalinity and oxygen supply. *Water Sci Technol* 52(7):127–133, 2005.

GEETS J., COOMANM. DE,WITTEBOLLE L., HEYLEN K.,VANPARYS B., VOS P. DE,VERSTRAETEW. & BOON N. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75, 211-221, 2007.

GIESEKE, A., NIELSEN, J.L., AMANN, R., NIELSEN, P.H., DE BEER, D. *In-situ* substrate conversion and assimilation by nitrifying bacteria in a model biofilm. *Environ. Microbiol.* 7 (9), 1392e1404, 2005.

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

GRAY, N.F. “Biology of wastewater treatment” Oxford University Press. New York, USA, 1992.

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* 71: 1066-1071, 2005.

HEIJNEN, J. J. Biological industrial waste-water treatment: minimizing biomass production and maximizing biomass concentration. PhD-thesis, TU Delft, 1994.

HELMER C., KUNST S., JURETSCHKO S., SCHMID M.C., SCHLEIFER K-H. AND WAGNER M. Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. *Water Science and Technology*, 39, 13-21, 1999.

HELMER, C., KUNST, S. Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. *Water Sci Technol*; 37:183–7, 1998.

HELMER, C., TROMM, C., HIPPEN, A., ROSENWINKEL, K. H., SEYFRIED, C. F., KUNST, S. Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems. *Water Sci Technol*; 43(1): 311–20, 2001.

HEUSER, T.; ZIMMER, W. Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks. (*Quercus robur* L.) by real time PCR. *FEMS Microbiology Letters*, v.209, p.295-299, 2002.

HIPPEN, A., ROSENWINKEL, K.-H., BAUMGARTEN, G., SEYFRIED, C.F. Aerobic deammonification – a new experience in the treatment of wastewaters. *Wat. Sci. Tech.* 35 10, 111–120, 1997.

HORÁKOVÁ, K.; MLEJNKOVÁ, H.; MLEJNEK, P. Evaluation of methods for isolation of DNA for polymerase chain reaction (PCR)- based identification of pathogenic bacteria from pure culture and water samples. *Water Science & Technology*, v. 58, n.5, p. 995-999, 2008.

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

HUMBERT, S., TARNAWSKI, S., FROMIN, N., MALLET, M. P., ARAGNO, M., ZOPFI, J. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. *ISME J* 4:450–454, 2010.

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

JETTEN, M. S. M. The microbial nitrogen cycle. *Environ Microbiol.* 10, 2903–2909, 2008.

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

JETTEN, M.S.M., VAN DONGEN, L.G.J.M., VAN LOOSDRECHT, M.C.M. The Combined Sharon/Anammox Process. Stowa: *Foundation for Applied Water Research* IWA Publishing. London, UK, 2002.

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

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

JETTEN, M. S. M., STROUS, M., VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T., SCHALK, J., VAN DONGEN, U. G., VAN DE GRAAF, A. A., LOGEMANN, S., MUYZER, G., VAN LOOSDRECHT, M. C., KUENEN, J. G. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol Rev* 22, 421–437, 1998.

JETTEN, M. S. M., HORN, S.J., VAN LOOSDRECHT, M.C.M., Towards a more sustainable wastewater treatment system. *Water Science and Technology* 35, 171-180, 1997.

JURETSCHKO, S., TIMMERMANN, G., SCHMID, M., SCHLEIFER, K. H., POMMERENING-RÖSER, A., KOOPS, H. P., WAGNER, M. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3042–3051, 1998.

KARTAL, B., KUENEN, J. G., LOOSDRECHT, M. C. M., Sewage treatment with anammox. *Science* 328 (5979), 702-703, 2010.

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

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

KARTAL, B., RATTRAY, J., VAN NIFTRIK, L. A., VAN DE VOSSENBERG, J., SCHMID, M. C., WEBB, R. I., SCHOUTEN, S., FUERSTE, J., DAMSTE J.S., JETTEN, M. J. M., STROUS, M. Candidatus “*Anammoxoglobus propionicus*” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 30:39-49, 2006.

KIELING, D.D. Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

KOENNECKE, M., BERNHARD, A. E., DE LA TORRE, J. R., WALKER, C. B., WATERBURY, J. B., STAHL, D. A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437, 543–546, 2005.

KUENEN J. G., SINNINGHE DAMSTÉ J. S., STROUS M., JETTEN M. S. M. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422: 608-611, 2003.

KUYPERS, M. M. M., LAVIK, G., WOEBKEN, D., SCHMID, M., FUCHS, B.M., AMANN, R., JORGENSEN, B.B., JETTEN, M. S. M. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6478–6483, 2005.

KUYPERS, M. M., SLIEKERS, A. O., LAVIK, G., SCHMID, M., JORGENSEN, B. B., KUENEN, J. G., DAMSTE, J. S., STROUS, M., JETTEN, M. S. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422:608–611, 2003.

LAM, P., JENSEN, M. M., LAVIK, G., MCGINNIS, D. F., MULLER, B., SCHUBERT, C.J., AMANN, R., THAMDRUP, B., KUYPERS, M. M. M. Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 7104–7109, 2007.

LARA, B. S., ARAÚJO, J. C., CHERNICHARO, C. A. L., Diferentes estratégias para o enriquecimento de biomassa anammox a partir de lodos aeróbio e anaeróbio. Trabalho completo publicado nos anais do 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 20-25 de setembro, Recife, Brasil, 2009.

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

MEYER, R.L., N. RISGAARD-PETERSEN, AND D.E. ALLEN. Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6142–6149, 2005.

MOBARRY, B.K., WAGNER, M., URBAIN, V., RITTMAN, B.E., STAHL, D.A., Phylogenetic probes for analysing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2156-2162, 1996.

MOLINA, A. L., TOBO, P. R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Einstein*. 2(2):139-42, 2004.

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* 48, N.6: 65-73, 2003.

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

MULLIS, K.B.; FALLONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v.155, p.335-350, 1987.

NAKAJIMA, J., SAKKA, M., KIMURA, T., FURUKAWA, K., SAKKA, K. Enrichment of anammox bacteria from marine environment for the construction of a bioremediation reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 1159–1166, 2008.

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

PENTON C.R., DEVOL, A.H. AND TIEDJE, J.M. Molecular Evidence for the Broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in Freshwater and Marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6829-6832, 2006.

PILLAI, S. D., JOSEPHSON K. L., BAILY R. L., GERBA C. P., PEPPER I. L. Rapid Method for Processing Soil Samples for Polymerase Chain Reaction Amplification of Specific Gene Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:2285-2286, 1991.

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

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

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

RICHARDS F. A., Anoxic basins and fjords, In: Ripley JP and Skirrow G, eds. *Chemical Oceanography*, London and New York: Academic Press, pp. 611–643, 1965.

ROSELLO-MORA, R. & AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 39:67, 2001.

ROTHAUWE, J. H., WITZEL, K. P., LIESACK, W. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol.*, 63, 4704–4712, 1997.

RYSGAARD, S., GLUD, R. N., RISGAARD-PETERSEN, N., DALSGAARD, T. Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments. *Limnol. Oceanogr.* 49:1493–1502, 2004.

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

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

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

SCHMID, M., WALSH, K., WEBB, R., RIJPSRA, W. I., VAN DE PASSCHOONEN, K., VERBRUGGEN, M.J., HILL, T., MOFFETT, B., FUERST, J., SCHOUTEN, S., DAMSTÉ,

J.S., HARRIS, J., SHAW, P., JETTEN, M., STROUS, M. Candidatus “*Scalindua brodae*”, sp. Nov., Candidatus “*Scalindua wagneri*”, sp. Nov. : Two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 529-538, 2003.

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

SCHMIDT, I., SLIEKERS, O., SCHMID, M., CIRPUS, I., STROUS, M., BOCK, E., KUENEN, J.G., and JETTEN, M.S.M. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria competitors or natural partners? *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 175–181, 2002.

SCHUBERT, C. J., Carsten J. Schubert, Kaiser, E. D., Wehrli, B., Thamdrup, B., Lam P., Kuypers, M. M. M. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environmental Microbiology*, v. 8, n. 10, p. 1857-1863, 2006.

SIEGRIST, H., REITHAAR, S., KOCH, G., LAIS, P. Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Water Sci Technol*; 38:241–8, 1998.

SLIEKERS, A. O., DERWORT, N., CAMPOS GOMEZ, J. L., STROUS, M., KUENEN, J. G., JETTEN, M. S. M. Completely autotrophic ammonia removal over nitrite in one reactor. *Water Res.* 36, 2475–2482, 2002.

STARKENBURG, S. R., CHAIN, P. S., SAYAVEDRA-SOTO, L. A., HAUSER, L., LAND, M. L., LARIMER, F. W., MALFATTI, S. A., KLOTZ, M. G., BOTTOMLEY, P. J., ARP, D. J., HICKEY, W. J. Genome sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Appl Environ Microbiol* 72, 2050–2063, 2006.

STROUS, M., PELLETIER, E., MANGENOT, S., RATTEI, T., LEHNER, A., TAYLOR, M. W., HORN, M., DAIMS, H., BARTOL-MAVEL, D., WINCKER, P., BARBE, V., FONKNECHTEN, N., VALLENET, D., SEGURENS, B., SCHENOWITZ-TRUONG, C., MÉDIGUE, C., COLLINGRO, A., SNEL, B., DUTILH, B. E. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* 440, 790–794, 2006.

STROUS, M. Microbiology of anaerobic ammonium oxidation. PhD thesis, Technical University Delft (The Netherlands), 2000.

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

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

STROUS, M., HEIJNEN, J.J., KUENEN, J.G., JETTEN, M.S.M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 589-596, 1998.

STROUS, M., VAN GERVEN, E., KUENEN, J. G., JETTEN, M. S. M. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2446–2448, 1997.

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

THAMDRUP, B., DALSGAARD, T. Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 68:1312–1318, 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* 49: 236-244, 2005.

THIRD, K. A., SLIEKERS, A. O., KUENEN, J. G., JETTEN, M. S. M. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *Syst Appl Microbiol.*; 24 (4): 588–596, 2001.

TIEDJE, J. M. “Ecology of Denitrification and Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium”. In: ZEHNDER, A. J. B.. “Biology of Anaerobic Microorganisms”. New York. John Wiley & Sons. Inc. cap. 4, p. 179-245, 1988.

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

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

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

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

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

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

VAN DER STAR, W. R. L., MICLEA, A. I., VAN DONGEN, U. G. J. M., MUYZER, G., PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The membrane bioreactor: a novel tool to grow Anammox bacteria as free cells, *Biotechnol. Bioeng.* 101; 286–294, 2008.

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

VAN NIFTRIK, L.A., FUERST, J. A., DAMSTÉ, J. S. S., KUENEN, J. G., JETTEN, M. S. M., STROUS, M., The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 233, 7–13, 2004.

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, 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., 2005b.

VANPARYS, B., BODELIER, P., DE VOS, P. Validation of the correct start codon of nxrX/nxrX and universality of the nxrAXB/nxrAXB gene cluster in Nitrobacter species. *Curr. Microbiol.* 53, 255–257, 2006.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3ª.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 452p. (*Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 1*). 2005.

WAGNER, M., RATH, G., KOOPS, H.P., FLOOD, J., AMANN, R., In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci. Technol.* 34, 237-244, 1996.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L.; Towards natural systems for organisms: proposal for the domain Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 4576-4579, 1990

WOESE, C.R. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*, Washington, 51, 221- 271, 1987.

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

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

9 APÊNDICES

9.1 *Preparo das soluções de uso no meio de cultura e na operação dos reatores estudados no presente trabalho*

9.1.1 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. A solução foi esterilizada em autoclave vertical por vapor úmido a 121° C por trinta minutos. Em seguida a solução foi devidamente rotulada e armazenada sob refrigeração.

9.1.2 Solução NaOH 0,5 M

Em um béquer de 100 mL, pesou-se 2,0 g de NaOH, utilizando-se balança analítica (marca Scientech com precisão de 0,0001g). Adicionou-se cerca de 80 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 100 mL e completou-se o volume com água deionizada. A solução foi armazenada em frasco de vidro esterilizado. A solução foi esterilizada em autoclave vertical por vapor úmido a 121° C por trinta minutos. Em seguida a solução foi devidamente rotulada e armazenada sob refrigeração.

9.1.3 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 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.

9.1.4 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.

9.1.5 Solução de micronutrientes I

Em dois béqueres de vidro de 50 mL, pesou-se respectivamente 1,000g de Na₂EDTA.2H₂O e 0,500g de FeSO₄, 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.

9.1.6 Solução de micronutrientes II

Em béqueres de vidro de 50 mL, pesou-se respectivamente 1,500g de Na₂EDTA.2H₂O, 0,043g de ZnSO₄.7H₂O, 0,024g CoCl₂, 0,099g MnCl₂.4H₂O, 0,025g CuSO₄.5H₂O, 0,022 g NaMoO₄.2H₂O, 0,019g NiCl₂.6H₂O, 0,008g Na₂SeO₃ e 0,0014g H₃BO₄, 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 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 em temperatura ambiente.

9.1.7 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.

9.1.8 Solução de hidroxilamina 100 mM

Mediu-se 1,11 mL de 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.

9.1.9 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.

9.1.10 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.

9.1.11 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.

9.1.12 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^+ .

9.1.13 Solução estoque de amônia 100 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.

9.1.14 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).

9.1.15 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.

9.1.16 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 ultra pura.

9.1.17 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 ultra pura.

9.2 Preparo das soluções utilizadas nas técnicas de biologia molecular empregadas na análise da biomassa

9.2.1 Solução de TAE 50X (pH = 7,5)

Em um béquer pesar 242g de tris e adicionar 57,1 mL de ácido acético glacial (capela de exaustão de gases) e 100 mL de EDTA 0,5M (pH = 8,0). Adicionar 600 mL de água Mili-Q. Acertar o pH até 7,5 com adição de HCl concentrado. Transferir a solução para um balão volumétrico de 1 litro e completar o volume com água Mili-Q até 1000 mL.

9.2.2 Solução de TAE 1X

Em um balão volumétrico de 1 litro adicionar 20 mL de TAE 50X e completar com 980 mL de água Mili-Q. Transferir para um frasco de vidro e armazenar a temperatura ambiente.

9.2.3 Solução tampão fosfato de sódio salino (PBS) 10X – (pH = 7,2 – 7,4)

Em um béquer pesar 75,97 g de NaCl ou aliquotar 260 mL da solução de NaCl 5M. Pesar também 9,94 g de Na₂HPO₄ e 4,14 g de NaH₂PO₄. Dissolver em 800 mL de água Mili-Q e levar ao Mag - Mix. Ajustar o pH com micropérolas de NaOH até o valor 7,2 (adicionar aos poucos as micropérolas). Transferir a solução para um balão volumétrico de 1 litro e completar o volume para 1000 mL com água Mili-Q. Transferir para um frasco de vidro e autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

9.2.4 Solução tampão fosfato de sódio salino (PBS) 1X

Em um balão volumétrico de 1 litro adicionar 100 mL de PBS 10X e completar com 900 mL de água Mili-Q. Transferir para um frasco de vidro e armazenar a temperatura ambiente.

9.2.5 Solução de EDTA 0,5M (pH = 8,0)

Em um béquer pesar 18,61 g de EDTA. Adicionar 80 ml de água destilada. Levar no agitador magnético e adicionar micropérolas de NaOH para dissolver a solução. Ajustar o pH para 8,0 com HCl. Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

9.2.6 Solução de NaCl 5M

Em um béquer pesar 292 g de NaCl. Adicionar 800 ml de água destilada. Transferir para um balão de 1 litro e ajustar o volume para 1000 ml com água destilada. Levar no agitador magnético para misturar bem. Transferir para um frasco de vidro e autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

9.2.7 Solução de TE (Tris-EDTA)

Aliquotar 1 mL da solução de Tris-HCl (1M, pH = 8,0) e 0,2 ml de solução de EDTA (0,5M, pH = 8,0), adicionar 80 mL de água Mili-Q. Ajustar o pH para 8,0. Completar o volume para 100 mL com água Mili-Q em um balão volumétrico de 100 mL. Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

9.2.8 Solução de TEN

Aliquotar 1 mL da solução de NaCl (0,5M) e 49 ml de solução de TE 1X. O pH já estará ajustado para 8,0. Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

9.2.9 Solução de álcool isoamílico : Clorofórmio (1:24)

Aliquotar 4 mL de Álcool Isoamílico (AIA) em capela de exaustão. Adicionar 96 mL de Clorofórmio em capela de exaustão. Estocar na geladeira em frasco escuro.

9.2.10 Solução de Tris-HCl (1 M)

Pesar 12,1 g de Tris base. Adicionar 80 ml de água destilada. Ajustar o pH para uma faixa entre 7,5 a 8,0 com HCl concentrado. Completar o volume para 100 ml utilizando um balão volumétrico.

9.2.11 Solução de fenol equilibrado

Adicionar 50 mL de fenol e 2,5 mL de tampão fenol (este procedimento tem que ser feito em capela de exaustão de gases com o uso de luvas). Esperar formar as duas fases no frasco mantendo-o dentro da geladeira, pois a formação das duas fases indica que o pH atingiu o valor de 8,0.

9.2.12 Solução de acetato de sódio 3M, pH=5,2

Em um béquer pesar 40,83 g de acetato de sódio tri-hidratado ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e adicionar 80 ml de água Mili-Q. Ajustar o pH para 5.2 com ácido acético glacial. Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

9.2.13 Solução de agarose 1%

Pesar 3,0 g de agarose. Dissolver em 300 mL de tampão TAE 1X. Levar ao forno microondas até dissolver a agarose completamente. Ir aquecendo por 30 segundos e agitando o frasco tipo Scoth com cuidado.

9.2.14 Solução de Loading (Tampão de corrida) 6X

Pesar 0,25 g de azul de bromofenol e 0,25 g de xileno cianol. Dissolver os dois reagentes em 7,0 ml de água destilada. Completar o volume para 10 mL com 3,0 ml de glicerol.

9.2.15 Solução contendo o marcador de peso molecular de 1Kb

Aliquotar em um tubo eppendorf 50 μL de Ladder. Adicionar 50 μL de Loading (Tampão de corrida). Adicionar 200 μL de água Mili-Q. A relação, portanto, é de 1 μL de marcador : 1 μL de Loading : 4 μL de H_2O .

9.2.16 Solução de brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Sempre manusear a solução de brometo de etídio com luva. Adicionar uma gota dessa solução de brometo concentrado (10mg/mL – marca Bioagency) em 400 ml de água destilada. Manter a solução concentrada em geladeira.

9.2.17 Solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) 20%

Em um béquer pesar 20g SDS (dodecil sulfato de sódio) e dissolver em 100 mL de H₂O Mili-Q sob aquecimento. Armazenar a temperatura ambiente.

9.2.18 Tampão de Fixação usado no protocolo de FISH

Aquecer 40 ml de água destilada a 55°C em um tubo Falcon de 50 mL. Adicionar 150 µl de 1M NaOH. Adicionar 2g de paraformaldeído e dissolvê-lo sob aquecimento e agitando o tubo delicadamente. Adicionar 5 ml de PBS 10X. Ajustar o pH para uma faixa de 7,2 a 7,4 com HCl concentrado (1 gota). Completar o volume para 50 ml com água destilada e armazenar em geladeira (por até 5 dias).

9.2.19 Tampão de Hibridação usado no protocolo de FISH

Para a solução estoque aliquotar 90 mL da solução de NaCl (5M). Aliquotar 5 mL da solução de EDTA (0,5M; pH = 8,0). Aliquotar 10 mL da solução de Tris-HCl 1M (pH = 8,0). Aliquotar 0,250 mL da solução de SDS 20%. Completar o volume para 500 mL com água destilada. Transferir para frasco tipo Scoth, autoclavar e estocar a temperatura ambiente. Para a solução de trabalho aliquotar um volume de tampão de hibridação de acordo com o volume de formamida usado para a sonda em questão, tendo 50 mL como volume final.

9.2.20 Tampão de Lavagem usado no protocolo de FISH

Para a solução estoque aliquotar 5 mL da solução de EDTA (0,5M; pH = 8,0). Aliquotar 0,250 mL da solução de SDS 20%. Aliquotar 10 mL da solução de Tris-HCl (1M; pH = 8,0). Completar o volume para 500 mL com água destilada. Transferir para frasco tipo Scoth, autoclavar e estocar a temperatura ambiente. Para a solução de trabalho, aliquotar um volume de tampão de lavagem de acordo com o volume de solução de NaCl 5M usado para a sonda em questão, tendo 50 mL como volume final. Por exemplo, para um tampão de lavagem que será utilizado juntamente com um tampão de hibridação a 40% deve-se adicionar 560 µL de NaCl 5M e completar o volume para 50 mL com o tampão de lavagem.