

**ENRIQUECIMENTO DE CONSÓRCIOS
MICROBIANOS EM QUIMIOSTATOS SOB
CONDIÇÕES *ANAMMOX***

Tiago Henrique Martins

Dissertação apresentada ao Departamento de hidráulica e Saneamento como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva

Março/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

M386e Martins, Tiago Henrique
Enriquecimento de consórcios microbianos em
quimiostatos sob condições *anammox* / Tiago Henrique
Martins ; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche
Silva. -- São Carlos, 2007.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Hidráulica e Saneamento) -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2007.

1. Tratamento de águas residuárias. 2. *Anammox*.
3. DGGE. 4. Nitrogênio. 5. Quimiostatos. 6. FISH.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO


Candidato: Bacharel **TIAGO HENRIQUE MARTINS**

Dissertação defendida e julgada em 13/04/2007 perante a Comissão Julgadora:



Aprovado

Prof.^a Dr.^a **MARIA BERNADETE AMANCIO VARESCHE SILVA (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)



APROVADO

Prof. Titular **EUGENIO FORESTI**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

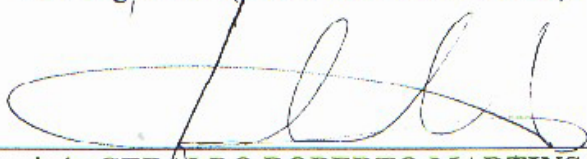


APROVADO.

Prof.^a Dr.^a **GIOVANA TOMMASO**
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP)



Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia (Hidráulica e Saneamento)



Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

Dedico este trabalho às minhas duas avós
Rosa Defavari Polizel e Virgínia Doriguelo Martins,
pela simplicidade de suas vidas e por serem as raízes de tudo.

AGRADECIMENTOS

À minha querida esposa Lis pelo Amor e Solidariedade na vida ao seu lado e a minha filha Sofia pela paciência e apoio na confecção deste “livro”.

À querida orientadora Professora Maria Bernadete pelo exemplo de vida acadêmico e incentivo profissional. Obrigado!

Ao Professor Eugênio Foresti pelas considerações na qualificação e incentivo durante o mestrado.

À Janja, Beth e Elô pela amizade e colaboração “infindáveis”.

Aos “Bacanões” Arnaldo, Luis e Leonardo pelos bons momentos no cafezinho regados a discussões altamente construtivas.

À Dani pela força e colaboração na biologia molecular e ao Daniel pelos ensinamentos em construções de árvores filogenéticas.

À Julia pelos ensinamentos na técnica do FISH.

Às minhas amigas de turma do mestrado e laboratório Érika e Carol.

À equipe de pesquisadores do LPB Mércia, Gunther, Iolanda, Lorena, Katita, Sandra, Renata, Lissa, Joel, Flávia, Alexandre Ono, Alexandre Struzziatto, Bruna, Luciano, a turma da iniciação científica.

Às secretárias do departamento Sá e Pavi, em especial à recepcionista Rose pelo bom humor e disposição em sempre ajudar.

À Professora Valéria Reginatto Spiller pelas amostras *anamnox* utilizadas como controle positivo nos ensaios de FISH.

Ao meu Grande amigo Virgílio Teixeira Machado pela amizade soberana.

Em especial aos meus pais André Martins e Maria Angélica Polizel Martins por sempre me apoiarem e incentivarem na vida científica.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos, processo 04/12236-0.

Obrigado a todos que participa(ra)m da minha não glamurosa, porém muito prazerosa vida científica.

MARTINS, T.H. (2007). *Enriquecimento de consórcios microbianos em quimiostatos sob condições anammox*. São Carlos, 2007. 58p Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Esta pesquisa objetivou enriquecer e purificar, em quimiostatos, consórcios microbianos capazes de oxidar amônia a nitrogênio (N_2), sob condições anaeróbias utilizando como inóculo: (Q1) biomassa de reator nitrificante-desnitrificante de estação de tratamento de água residuária de indústria produtora de aminoácidos (Ajinomoto) e (Q2) lodo granular de reator UASB de abatedouro de aves (Avícola DACAR, TIETÊ). Os inóculos foram enriquecidos em quimiostatos com vazão afluyente de 18ml/h de meio basal específico com concentrações médias de 80mg $N-NH_4^+/L$, 75,2mg $N-NO_2^-/L$ e 1000mg/l de bicarbonato como única fonte de carbono. Nos quimiostatos Q1 e Q2 as eficiências médias de remoção foram de 51,6% e 39,3% de amônia e 60,5% e 53,2% de nitrito, respectivamente, após 296 dias de operação. A eficiência média de remoção de nitrogênio total ($N-NH_4^+ + N-NO_2^-$) foi de 57,1% e 43% após 296 dias de operação, respectivamente para Q1 e Q2. A purificação dos consórcios enriquecidos foi realizada utilizando-se metodologia de gradiente de densidade por centrifugação *Percoll*. Os consórcios microbianos foram observados por exames microscópicos e a diversidade foi avaliada por DGGE antes e depois da purificação pelo protocolo *Percoll*. O DGGE revelou mudança na estrutura dos consórcios presentes em Q1 e Q2 no decorrer do período de operação dos quimiostatos. A técnica de hibridação *in situ* (FISH) com sonda fluorescente (Amx - 368) confirmou a presença de microrganismos *anammox* nos dois consórcios microbianos. O seqüenciamento do DNA ribossomal 16S de bandas obtidas do gel de DGGE, utilizando-se *primers* universais para Domínio *Bacteria*, relacionou por árvore de máxima verossimilhança, duas bandas com o grupo das Bactérias verdes não-sulfurosas.

Palavras-chaves: *Anammox*, DGGE, nitrogênio, quimiostatos, FISH.

MARTINS, T.H. (2007). *Enrichment of microbial trusts in chemostats with anammox conditions*. São Carlos, 2007. 58p Dissertation (Master) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

This research aimed to enrich and to purify, in chemostats, microbial trusts capable to realize ammonium oxidation to dinitrogen (N_2) under anaerobic conditions, using as inoculum: (Q1) biomass from nitrifying-denitrifying reactor of wastewater treatment plant of amino-acids industry (Ajinomoto) and (Q2) granular sludge from upflow anaerobic sludge blanket UASB reactor treating poultry wastes - Avícola DACAR, TIETÊ. The inoculum was enriched in chemostats with affluent flow of 18ml/h of specific basal media with mean concentrations of 80mg $N-NH_4^+$ /L, 75.2mg NO_2^- /L and 1000mg/l of bicarbonate as sole carbon source. In Q1 and Q2 chemostats the mean efficiency of removal were 51.6% and 39.3% of ammonium, and 60.5% and 53.2% of nitrite, respectively, after 296 days of operation. In Q1 and Q2 chemostats, the mean efficiency of total nitrogen removal ($N-NH_4^+ + NO_2^-$) were 57.1% and 43%, respectively, after 296 days of operation. The purification of enriched microbial trusts was carried following methodology of density gradient by centrifugation (*Percoll*). The microbial trusts were observed by microscopic analysis and the diversity was evaluated by DGGE, before and after the purification by the *Percoll* protocol. The DGGE analysis showed changes in microbial trusts structure in Q1 and Q2 in chemostats operation period. The fluorescence *in situ* hybridization technique (FISH) with Amx-368 probe confirmed the presence of *anammox* microorganisms in both microbial trusts. The sequencing of recovered bands of DGGE was carried through ribosomal DNA 16S using universal primers for Bacteria *Domain* that related two bands with green non-sulphur Bacterium using maximum likelihood tree.

Keywords: *Anammox*, DGGE, nitrogen, chemostats, FISH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Esquema do catabolismo <i>anammox</i> . NIR= nitrito redutase, HH= hidrazina hidrolase, HAO= hidroxilamina oxido-redutase.....	4
Figura 4.1. Organograma das etapas experimentais.....	12
Figura 4.2. Esquema do quimiostato.....	15
Figura 4.3. Microscopia óptica de campo claro da superfície das pérolas de vidro após ataque de ácido fluorídrico (aumento de 100 vezes).....	16
Figura 4.4. Representação esquemática do FISH.....	18
Figura 4.5. Fluxograma da análise dos consórcios microbianos presentes em Q1 e Q2 utilizando técnica PCR/DGGE.....	19
Figura 5.1. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q1 com 70 dias de operação.....	22
Figura 5.2. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q1 com 105 dias: (a) cocos agrupados; (b) bacilos sem divisão completa.....	23
Figura 5.3. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q1 com 105 dias: (a) cocos agrupados; (b) coco-bacilos e cocos em matriz extracelular.....	23
Figura 5.4. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q1 com 109 dias: (a) matriz extracelular rompida; (b) novos aglomerados se formando; (c) bacilos sem divisão completa; (d) cocos aglomerados.....	24
Figura 5.5. Coloração de Gram em microscopia de campo claro da biomassa crescida em Q1 com 148 dias.....	25
Figura 5.6. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q2 com 70 dias de operação.....	26
Figura 5.7. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q2 com 105 dias: (a) bacilos pleomórficos; (b) bacilos sem divisão completa; (c) biofilme de células aglomeradas; (d) cocos agrupados.....	26
Figura 5.8. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q2 com 109 dias.....	27
Figura 5.9. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q2 com 109 dias: (a) cocos aglomerados; (b) cocos e coco-bacilos suspensos.....	27
Figura 5.10. Coloração de Gram em microscopia de campo claro da biomassa crescida em Q2 com 148 dias: (a) células planctônicas Gram negativas; (b) aglomerado de cocos Gram negativos e bacilos Gram positivos.....	27
Figura 5.11. Variação temporal da concentração de nitrogênio na forma de amônia afluyente e efluyente em Q1 e Q2.....	30
Figura 5.12. Foto da parte inferior de Q1 mostrando pérolas imobilizadas, grânulos de biomassa e tubo de saída.....	31
Figura 5.13. Variação temporal da concentração de nitrogênio na forma de nitrito e nitrato afluyente e efluyente em Q1 e Q2.....	33
Figura 5.14. Microscopia de contraste de fase do consórcio enriquecido em Q1 com 312 dias de operação.....	39
Figura 5.15. Microscopia de epifluorescência do consórcio enriquecido em Q1 com 312 dias de operação coradas com DAPI.....	40
Figura 5.16. Microscopia de epifluorescência do consórcio enriquecido em Q1 com 312 dias de	

operação hibridadas com sonda AMX-368 CY3.....	40
Figura 5.17. Microscopia de contraste de fase do consórcio enriquecido em Q2 com 312 dias de operação.....	41
Figura 5.18. Microscopia de epifluorescência do consórcio enriquecido em Q2 com 312 dias de operação coradas com DAPI.....	41
Figura 5.19. Microscopia de epifluorescência do consórcio enriquecido em Q2 com 312 dias de operação hibridadas com sonda AMX-368 CY3.....	42
Figura 5.20. Fotografia da análise de DGGE de produtos de PCR com <i>primers</i> universais para Domínio <i>Bacteria</i> (968F-1392R) das amostras do Quimiostato Q1. Canaleta 1 = inóculo, 2 = 143 dias, 3 = 197 dias, 4 = 197 dias após purificação (Percoll), 5 = 262 dias, 6 = 262 dias após purificação (Percoll), 7 316 dias.....	43
Figura 5.21. Fotografia da análise de DGGE de produtos de PCR com <i>primers</i> universais para Domínio <i>Bacteria</i> (968F-1392R) das amostras do Quimiostato Q2. Canaleta 1 = inóculo, 2 = 143 dias, 3 = 197 dias, 4 = 197 dias após purificação (Percoll), 5 = 262 dias, 6 = 262 dias após purificação (Percoll), 7 316 dias.....	44
Figura 5.22. Fotografia da análise de DGGE de produtos de PCR com <i>primers</i> universais para Domínio <i>Bacteria</i> (968F-1392R) das amostras do Quimiostato Q1, com bandas retiradas para seqüenciamento. Canaleta 1 = inóculo, 2 = 143 dias, 3 = 197 dias, 4 = 197 dias após purificação (Percoll), 5 = 262 dias, 6 = 262 dias após purificação (Percoll), 7 316 dias.....	45
Figura 5.23. Fotografia da análise de DGGE de produtos de PCR com <i>primers</i> universais para Domínio <i>Bacteria</i> (968F-1392R) das amostras do Quimiostato Q2, com bandas retiradas para seqüenciamento. Canaleta 1 = inóculo, 2 = 143 dias, 3 = 197 dias, 4 = 197 dias após purificação (Percoll), 5 = 262 dias, 6 = 262 dias após purificação (Percoll), 7 316 dias.....	46
Figura 5.24. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do DNA ribossomal 16S, mostrando similaridades entre seqüências obtidas das bandas 7 e 9 e membros do grupo das Bactérias verdes não sulfurosas, filo <i>Planctomyces</i> , <i>Bacterioidetes</i> , Actinobactérias, <i>Firmicutes</i> e <i>Proteobacteria</i> . A barra significa distância filogenética relativa, observada somente horizontalmente, entre dois ramos da árvore.....	48
Figura 5.25. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do DNA ribossomal 16S das seqüências 7 e 9 em relação ao grupo de bactérias verdes não-sulfurosas (<i>Chloroflexi</i>) mais relacionadas, bactérias <i>anammox</i> , <i>E. coli</i> . <i>Aquifex aeolicus</i> foi utilizado como grupo externo. A barra significa distância filogenética relativa entre dois ramos da árvore.....	50
Figura 5.26. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do DNA ribossomal 16S das seqüências 7 e 9 em relação ao grupo de bactérias verdes não-sulfurosas (<i>Chloroflexi</i>). <i>Aquifex aeolicus</i> foi utilizado como grupo externo. A barra significa distância filogenética relativa entre dois ramos da árvore.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Descrição das sondas para FISH.....	8
Tabela 4.1. Etapas de operação dos quimiostatos.....	12
Tabela 4.2. Composição do meio basal de cultivo.....	14
Tabela 4.3. Composição da Solução Traço I.....	14
Tabela 4.4. Composição da Solução Traço II.....	14
Tabela 4.5. Protocolo de purificação da cultura <i>anammox</i>	17
Tabela 4.6. Soluções Tampão de hibridação e lavagem utilizadas na técnica FISH.....	18
Tabela 4.7. Protocolo de extração de DNA.....	20
Tabela 4.8. <i>Primers</i> utilizados para DGGE.....	21
Tabela 5.1. Concentração da biomassa como STV nos quimiostatos.....	28
Tabela 5.2. Análises dos compostos nitrogenados no frasco de alimentação e na entrada dos quimiostatos.....	30
Tabela 5.3. Quantidade removida de nitrogênio na forma dos compostos nitrogenados e proporção de remoção.....	35
Tabela 5.4. Parâmetros estequiométricos de amônia e nitrito removidos e nitrato gerado, a partir do 274° dia de operação.....	36
Tabela 5.5. Comparação entre parâmetros estequiométricos encontrados na literatura e desta pesquisa.....	36
Tabela 5.6. Carga volumétrica de cada composto nitrogenado e total e respectivas remoções médias (\pm desvio padrão), nos dois períodos de estabilização de Q1.....	38
Tabela 5.7. Carga volumétrica de cada composto nitrogenado e total e respectivas remoções médias (\pm desvio padrão), nos dois períodos de estabilização de Q2.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANAMMOX – anaerobic ammonium oxidation (oxidação anaeróbia da amônia)
ASBR – reator anaeróbio seqüencial de batelada
CANON – Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrito
CCCP – cianeto de carbonil *m*-clorofenilhidrazona
DGGE – eletrofose em gel por gradiente desnaturante
DNA – ácido desoxirribonucléico
DNAr – seqüência de DNA que codifica o ribossomo 16S
DQO – demanda química de oxigênio
EDTA – ácido etinodiaminotetra acético
FIA – análise por injeção em fluxo
FISH – Hibridação *in situ* com sondas fluorescentes
N-NH₄⁺ – nitrogênio na forma de ion amônio
N-NO₂⁻ – nitrogênio na forma de nitrito
N-NO₃⁻ – nitrogênio na forma de nitrato
g – unidade de centrifugação (gravidade)
μ_{max} – velocidade máxima de crescimento
PBS – *Phosphate-Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)
PCR – reação em cadeia da polimerase
PVC – poli cloreto de vinila
pH – potencial hidrogeniônico
Q1– quimiostato 1 (inóculo de reator UASB de abatedouro de aves- Avícola DACAR, Tietê)
Q2 – quimiostato 2 (inóculo de indústria alimentícia AJINOMOTO-Valparaíso)
RNA – ácido ribonucléico
RSB – reator seqüencial de batelada
SDS – dodecil sulfonato de sódio
SSV – sólidos suspensos voláteis
SHARON Single reactor system for high ammonium removal over nitrite
STV – sólidos totais voláteis
TDH – tempo de detenção hidráulica
UASB reator – reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo
UV – ultravioleta
°C – graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3.1. <i>ANAMMOX</i>	2
3.2. TECNOLOGIAS NÃO-CONVENCIONAIS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. ORGANOGRAMA EXPERIMENTAL.....	11
4.2. INÓCULO.....	12
4.3. ENRIQUECIMENTO.....	13
4.4. MEIO DE CULTIVO.....	13
4.5. OPERAÇÃO DOS QUIMIOSTATOS <i>ANAMMOX</i>	14
4.6. EXAMES MICROSCÓPICOS.....	16
4.7. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	16
4.8. PURIFICAÇÃO.....	17
4.9. TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	17
4.9.1. Hibridação <i>in situ</i> com Sondas Fluorescentes.....	17
4.9.2. Análises da Diversidade dos Consórcios Microbianos.....	19
4.9.3. Reação em Cadeia da Polimerase e Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (PCR/DGGE).....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS CONSÓCIOS ENRIQUECIDOS.....	22
5.2. OPERAÇÃO DOS QUIMIOSTATOS.....	28
5.2.1. REMOÇÃO DO NITROGÊNIO AMONÍACAL.....	28
5.2.2. REMOÇÃO DO NITROGÊNIO NA FORMA DE NITRITO E PRODUÇÃO DE NITRATO.....	31
5.3. HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> COM SONDAS FLUORESCENTES (FISH).....	39
5.4. ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA.....	42
5.5. SEQÜENCIAMENTO DE BANDA E FILOGENIA.....	44
6. CONCLUSÕES.....	52
7. RECOMENDAÇÕES FUTURAS.....	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

A poluição por compostos nitrogenados, principalmente, o excesso de amônia nos corpos d'água advindo das práticas de fertilização e de lançamentos de águas residuárias, é causa de preocupação. Esse nitrogênio, descarregado na natureza, afeta os ciclos biogeoquímicos por estimular organismos fotossintetizantes, que fixam carbono e aumentam a concentração da biomassa presente nos corpos d'água.

A nitrificação e desnitrificação são processos consolidados na remoção de nitrogênio em estações de tratamento de águas residuárias e esgoto sanitário (Verstraete & Philips, 1998; Schimidt *et al.*, 2003).

Além da nitrificação clássica, a amônia também pode ser oxidada em ambientes anaeróbios, no processo conhecido como *anammox* (oxidação anaeróbia da amônia). Esse processo envolve a remoção de nitrogênio, de águas residuárias, sob condições anaeróbias, principalmente aquelas com teores reduzidos de matéria orgânica (Strous *et al.*, 1999a). Do ponto de vista da preservação ambiental, o processo *anammox* pode ser considerado uma perspectiva para o tratamento de águas residuárias anaeróbias, promovendo a remoção de amônia e aminas (Madigan *et al.*, 2004).

As bactérias capazes de oxidar amônia anaerobiamente eram desconhecidas até a década de 1990, e em 1977, BRODA considerou-as como "litotróficas perdidas na natureza". Segundo o autor, essa rota metabólica era reconhecida por ser termodinamicamente possível, mas os microrganismos quimioautotróficos responsáveis, nunca haviam sido encontrados.

MULDER *et al.* (1995) descreveram esse processo em reator desnitrificante, em escala piloto, em Gist-brocades, Delft (Holanda). Os autores observaram que a amônia e nitrato eram consumidos com concomitante produção de gás nitrogênio. As evidências da oxidação anaeróbia da amônia foram baseadas nos balanços de nitrogênio; ou seja, 5mols de amônia para cada 3mols de nitrato, formando 4mols de nitrogênio gasoso. Experimentos com reatores em batelada, realizados posteriormente, demonstraram que a conversão foi dependente de nitrato.

Devido à configuração básica, o processo *anammox* é uma opção para o tratamento biológico de águas residuárias (Strous *et al.*, 1997b; Jetten *et al.*, 1999). Thamdrup & Dalsgaard (2002) relataram que este processo contribui até 67% na produção de nitrogênio (N₂) nos oceanos.

Segundo JETTEN *et al.* (2001a), a aplicação do processo *anammox* para remoção de

nitrogênio pode reduzir os custos operacionais em até 90%, focalizando principalmente águas residuárias com elevadas concentrações de nitrogênio e reduzidas concentrações de matéria orgânica como, por exemplo, efluentes de digestores de lodo.

Desse modo, a presente pesquisa visou contribuir para o entendimento do processo *anammox* através do enriquecimento de consórcios microbianos em quimiostatos; uma vez que a obtenção dessas células é possível após 150 dias de operação em função do tempo de geração elevado (11 a 29 dias).

2. OBJETIVOS

- Enriquecer em quimiostatos, separadamente, dois inóculos em condições *anammox*;
- Purificar as culturas enriquecidas utilizando protocolo *Percoll*;
- Avaliar a diversidade genética dos consórcios microbianos enriquecidos utilizando a técnica do DGGE,
- Utilizar a técnica de hibridação *in situ* (FISH) para confirmar a presença de consórcio microbiano *anammox*,
- Aproximar filogeneticamente a cultura purificada utilizando o seqüenciamento parcial do DNA ribossomal 16S.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ANAMMOX (ANAerobic AMMonium OXidation/oxidação anaeróbia da amônia)

A *anammox* é o processo biológico em que a oxidação da amônia ocorre concomitantemente à redução do nitrito utilizando carbono inorgânico para crescimento microbiano. Pelo menos três enzimas estão envolvidas diretamente neste processo, a nitrito redutase, hidrazina hidrolase e hidroxilamina oxido-redutase (Figura 3.1).

Esse processo é mediado por bactérias da Ordem *Planctomycetales* (Strous *et al.*, 1999a). Existem quatro gêneros descritos e sete espécies, tais como: *Candidatus* “*Brocadia anammoxidans*”, “*B. fulgida*”, *Candidatus* “*Kuenenia stuttgartiensis*”, *Candidatus* “*Anammoxoglobus propionicus*” e *Candidatus* “*Scalindua brodae*”, “*S. wagneri*” “*S. sorokinii*”; sendo esta última encontrada no Mar Negro.

Estudos filogenéticos utilizando seqüências do RNA ribossomal 16S identificaram esses microrganismos autotróficos como sendo relacionados aos membros da Divisão *Planctomycetes* (Ordem *Planctomycetales*) do Domínio *Bacteria*. Anteriormente, acreditava-se que os planctomicetos eram de limitada relevância ambiental, mas recentes estudos em ecologia microbiana mostraram que essas bactérias são ubíquas (STROUS *et al.*, 1999a).

Segundo FUERST (1995) as bactérias pertencentes à classe *Planctomycetales* pertencem a um dos mais distintos grupos do domínio *Bacteria*. Os planctomicetos não possuem peptidoglicano em sua parede celular, na superfície celular são observadas estruturas crateriformes, compartimentalização citoplasmática e reprodução diferente dos demais grupos.

O catabolismo *anammox* é realizado no compartimento intracitoplasmático limitado por membrana, chamado *anamoxossomo* (Figura 3.1). Este compartimento tem uma delicada membrana impermeável devido aos lipídeos que a compõe (Sinnighe *et al.*, 2002), e contém pequenas quantidades de DNA ou RNA (Lindsay *et al.*, 2001).

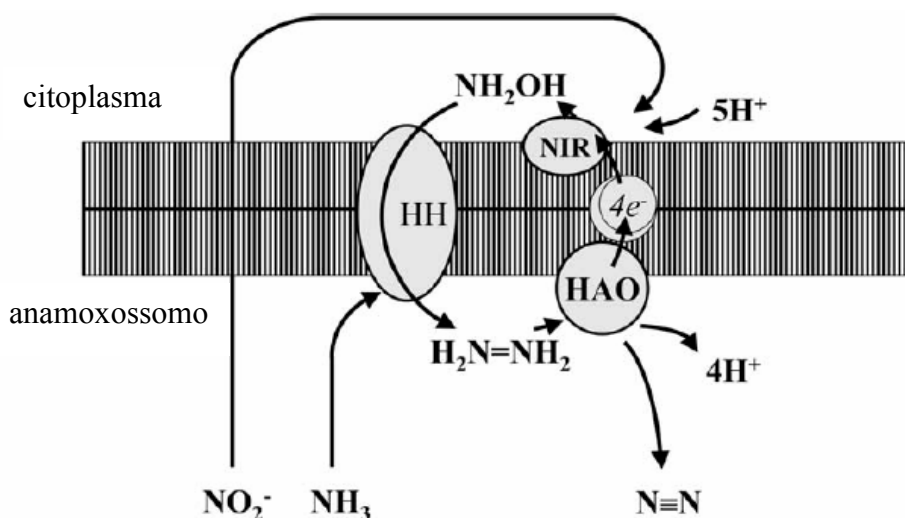


Figura 3.1. Esquema do catabolismo *anammox*. NIR= nitrito redutase, HH= hidrazina hidrolase, HAO= hidroxilamina oxido-redutase.
Fonte: JETTEN *et al.* (2002) (adaptado).

SINNINGHE-DAMSTE *et al.* (2002) estudaram profundamente a membrana presente no anamoxossomo, e observaram que esta é muito menos permeável que as demais biomembranas, sendo constituída por lipídeos em forma de escada, chamados *ladderane*. Além desta característica, os autores encontraram ligações diéter e éster entre os lipídeos e glicerol desta membrana. A ligação éter é encontrada, principalmente, em microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea*, no entanto bactérias termófilas de ramificação antiga

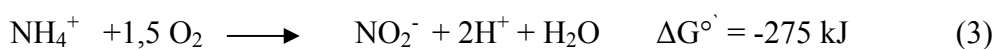
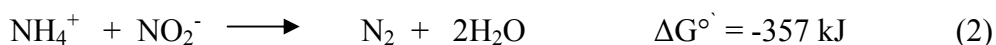
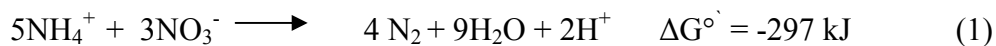
como *Thermotoga* e *Aquifex* têm ligações éster e éter, assim como, dois gêneros de bactérias redutoras de sulfato mesofílicas *Desulfosarcina variabilis* e *Desulforhabdus amnigenus*.

MULDER *et al.* (1995) observaram consumo de amônia, em reator desnitrificante de leite fluidificado, aplicado ao tratamento do efluente de reator metanogênico de fábrica de produção de fermento, em Delft (Holanda), após 420 dias de operação, à taxa de remoção de 0,4KgN/m³/dia. A possibilidade da ocorrência da nitrificação aeróbia foi descartada, porque, seria necessária concentração de 1,8KgO₂/m³/dia, para ocorrência desse processo. Além disso, não foi encontrado oxigênio molecular nas amostras.

VAN DE GRAAF *et al.* (1995) provaram que o processo *anammox* é biológico. Os autores realizaram experimentos em batelada, sob condições anaeróbias. Os reatores controle foram preparados com água residuária, sem inóculo (lodo utilizado por MULDER *et al.*, 1995) ou com lodo esterilizado em autoclave ou por radiação gama. Nos reatores alimentados com cloranfenicol, ampicilina, 2,4 diclorofenol, cianeto de carbonil *m*-clorofenilhidrazona (CCCP) e cloreto de mercúrio o processo foi completamente inibido. Nos reatores com inóculo, 110mg/L de amônia foram oxidadas em 9 dias. Os autores verificaram, também, que a remoção da amônia foi proporcional à quantidade de inóculo inicial e não relacionada à concentração de substrato.

VAN DE GRAAF *et al.* (1997) observaram a produção exclusiva de ¹⁴⁻¹⁵N₂ em experimentos com amônia (¹⁵NH₄⁺) e nitrato (¹⁴NO₃⁻) em reatores de batelada. Esses resultados não estão em acordo com a reação postulada por MULDER *et al.* (1995), como descrito na (Equação 1). Ou seja, cada N-amoniaco requer 0,6 N-nitrato produzindo 0,8 N₂, portanto, 75% do gás deveria estar na forma ¹⁴⁻¹⁵N₂ e 25% ¹⁵⁻¹⁵N₂. No entanto, se o nitrito fosse o aceptor de elétrons, no lugar do nitrato, os resultados observados e calculados estariam em acordo com a Equação 2.

A *anammox* envolve a oxidação da amônia, utilizando o nitrito como aceptor de elétrons, para produzir nitrogênio gasoso (Equação 2). A nitrificação aeróbia ocorre segundo as Equações 3 ou 4. Tais equações demonstram que o processo anaeróbio é energeticamente mais favorável (Jetten *et al.*, 1999a).



Em experimentos em batelada, com *Brocadia anammoxidans* foi verificada inibição

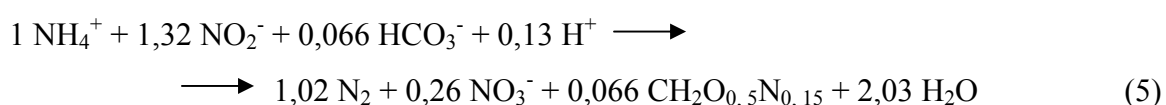
irreversível, quando nitrito e fosfato, em concentrações acima de 98mg/L e 60mg/L, respectivamente foram adicionados separadamente nos sistemas (Van de Graaf *et al.*, 1996; Strous *et al.*, 1997a; Strous *et al.*, 1997b). Outra cultura, *Kuenenia stuttgartiensis* tolerou até 180mg/L de nitrito e 600mg/L de fosfato (Egli *et al.*, 2001) As duas espécies cresceram adequadamente a 37°C e pH 8.

A influência do oxigênio no processo *anammox* foi investigada por STROUS *et al.* (1997a) em reator de batelada. O reator, alimentado com 84mgN-NH₄⁺/L e 112mgN-NO₂⁻/L, foi monitorado durante 20 dias, com ciclos de 2h alternados com aeração (O₂) e anaerobiose (argônio). O processo *anammox* foi observado somente nos períodos anaeróbios. No período aeróbio não foi observado decréscimo da amônia por nitrificação. Nesse reator em batelada não foi verificada a ocorrência da *anammox* sob microaerofilia, para tensões de oxigênio iguais a 2, 1, 0,5%. Porém, o processo foi restabelecido sob anaerobiose, demonstrando que a inibição foi reversível.

A fisiologia de cultura *anammox* foi estudada por STROUS *et al.* (1999b) em reatores em batelada. A taxa máxima de consumo de amônia foi de 1,1g N-NH₄⁺/g proteína/dia. Concentrações de até 1gN/L na forma de amônia ou nitrato não inibiram a *anammox*. No entanto, valores acima de 100mgN/L de nitrito (por vários dias) inibiram o processo. Todavia, a adição de 1,4mgN/L de hidrazina e 0,7mg-N/L de hidroxilamina (intermediários da *anammox*) restabeleceram o metabolismo.

STROUS *et al.*, (1998) observaram 90% de retenção da biomassa em reator anaeróbio em batelada seqüencial (ASBR). Essa retenção foi importante para o processo *anammox* devido ao longo tempo de geração celular. Os autores verificaram, também, outras características favoráveis ao processo e relacionadas com os seguintes aspectos: (1) distribuição homogênea dos substratos, (2) operação segura por mais de um ano, (3) estabilidade sob condições limitantes de substrato.

Baseado no balanço de massa de nitrogênio e carbono, experimentos com culturas *anammox* enriquecidas indicaram a reação estequiométrica descrita na Equação 5 (Strous *et al.*, 1998). Todavia, a proporção de nitrito e amônia não foi exatamente 1:1, considerando que parte do nitrito oxida a nitrato na rota de redução do CO₂ (Van de Graaf *et al.*, 1996).



JETTEN *et al.* (1999), utilizaram como inóculo biomassa do reator desnitrificante

em escala piloto e obtiveram culturas enriquecidas em 4 meses. Essa cultura enriquecida foi inoculada em reator de leito fluidificado alimentado com meio sintético contendo amônia (70-420mgN-NH₄⁺/L), nitrito (70-490mg N-NO₂⁻/L), bicarbonato de sódio (1,25g/L) e elementos traços. Durante 27 meses foram monitoradas as concentrações de amônia, nitrito e as respectivas remoções foram de 84,6% e 99,5%. Sob tais condições, a velocidade máxima de crescimento (μ) e tempo de geração (Tg) foram de 0,001 h⁻¹ e 29 dias, respectivamente.

JONES *et al.* (2000) destacaram que a oxidação anaeróbia da amônia pode ser de importância significativa em lagoas anaeróbias devido, principalmente, ao longo tempo de armazenamento comum em tais sistemas. Essa característica é importante na formação de agregados celulares e, por conseguinte poderá favorecer a liberação de nitrogênio molecular renovando o ciclo do nitrogênio.

THAMDRUP & DALSGAARD (2002) observaram oxidação anaeróbia da amônia associada à redução do nitrato em três amostras de sedimento marinho provenientes do Norte do Mar Báltico e obtidas a 16, 380 e 695m de profundidade, em temperaturas de 6,5; 6 e 5,5 °C, respectivamente. A *anammox* correspondeu a 2, 24 e 67% da produção de N₂, respectivamente nessas amostras ambientais. Todavia, a desnitrificação foi o processo mais importante para amostras de sedimento coletadas a 16m de profundidade. Essas observações indicaram que a *anammox* pode ocorrer, também, em baixas temperaturas.

Após três meses de operação de reator granular de leito expandido, inoculado com lodo de estação de tratamento de água residuária de cervejaria, JAINLONG & JING (2005) observaram 98% de remoção de 250mg N-NO₂⁻/L e 40% de remoção de 250mgN-NH₄⁺/L nesse reator. No entanto, essa desproporcionalidade entre nitrito e amônia, em relação ao processo *anammox*, ocorreu em função da carga orgânica (dextrose) afluyente; ou seja, 500mg DQO/L. Desse modo, os autores destacaram que o processo *anammox* pode ocorrer em reatores que recebem água residuária com matéria orgânica.

EGLI *et al.* (2001) obtiveram 88% de bactérias *anammox* (quantificação por FISH) por método de enriquecimento em reator com biodisco rotativo usado no tratamento de chorume contendo elevadas concentrações de amônia e teores reduzidos de carbono orgânico. A cultura purificada apresentou tolerância de até 600mg/L de fosfato e 182 mgN-NO₂⁻/L; ou seja, valores maiores que os observados para *Brocadia anammoxidans*. Todavia, a atividade catalítica *anammox* foi até 20 vezes menor que *B. anammoxidans*. Análises do seqüenciamento do DNA ribossomal 16S revelaram que a cultura apresentou 90,9% de similaridade com *B. anammoxidans* e 98,5% com *Kuenenia stuttgartiensis*.

TOH *et al.* (2002) enriqueceram consórcio microbiano, capaz de oxidar anaerobiamente, a amônia a partir de lodo de estação de tratamento de esgoto municipal (Sydney-Austrália). Para iniciar o enriquecimento, os autores adicionaram 100mg/L de cloramfenicol para inibir a microbiota desnitrificante, uma vez que os microrganismos *anammox* não são suscetíveis a esse antibiótico. O consórcio apresentou 50% de bactérias *anammox* (FISH) e afinidade com *B. anammoxidans*, utilizando-se sonda específica para este microrganismo. Além disso, foi capaz de remover até 60mg N/dia em reator de fluxo contínuo operado com vazão de 25mL/h, após 243 dias de operação.

KUYPERS *et al.* (2003) observaram pela primeira vez, em amostras do Mar Negro, células *anammox* planctônicas. Segundo os autores a presença de tais células pode ser de importante relevância na regeneração do N₂ a partir do nitrogênio fixo em zonas anóxicas. Para comprovar o processo *anammox* no Mar Negro os pesquisadores retiraram amostras da coluna d'água de várias profundidades e incubaram com nitrito (¹⁴N) e amônia (¹⁵N) e encontraram N₂ (¹⁴N¹⁵N) no biogás. Os autores, também, extraíram e analisaram a composição dos lipídeos *ladderane*, encontrando três tipos, somente nas amostras de onde ocorreu a maior porcentagem de ¹⁴N¹⁵N no biogás. Análises filogenéticas do DNA ribossomal 16S indicaram que se tratava de novo gênero nomeado *Candidatus* "Scalindua sorokinii". Nova sonda de FISH (S-*-BS-820-a-A-22) foi desenhada para esses organismos que apresentaram a incomum organela com lipídeos *ladderane* (Tabela 3.1).

Ainda em 2003, SCHMID *et al.* encontraram mais duas espécies do gênero *Scalindua*, *Candidatus* "S. brodae" e "S. wagneri" no biofilme do reator nitrificante com biodiscos rotativos, sob condições limitantes de oxigênio utilizado no tratamento de chorume, situado na cidade de Pitsea (Reino Unido). O biofilme tinha elevada atividade *anammox*, ou seja, 5nmol/mg proteína.min, correspondendo a 25% da atividade relatada para reatores enriquecidos com 80% de células *anammox*, sob condições similares. No entanto, a sonda descrita por SCHMID *et al.* (2000) (S-*-Amx-0820-a-A-22) não detectou a presença de *K. stuttgartiensis* ou *B. anammoxidans*. Todavia, a sonda S-P-Planc-0046-a-A-18 (Neef *et al.*, 1998) revelou que 20% da comunidade microbiana total pertencia à ordem *Planctomycetales*. Os autores então desenharam três novas sondas: S-G-Sca-1309-a-A-21 para o *Scalindua*, S-*-Scabr-1114-a-A-22 para *S. brodae* e uma sonda para todos os microrganismos *anammox* (S-*-Amx-0368-a-A-18) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Descrição das sondas para FISH

Sonda	Seqüência 5' → 3'	Especificidade	Referência
S-P-Planc-0046-a-A-18	GACTTGCATGCCTAATCC	Orden <i>Plactomycetales</i>	Neef <i>et al.</i> 1998
S*-Amx-0820-a-A-22	AAAACCCCTCTACTTAGTGCC	<i>Cand.</i> “Brocadia anamnoxidans” “Kuenenia stuttgartiensis”	Schmid <i>et al.</i> 2000
S*-Kst-1225-a-A-20	TCGGCTTTATAGGTTTCGCA	<i>Candidatus</i> “Kuenenia stuttgartiensis”	Schmid <i>et al.</i> 2000
S-G-Sca-1309-a-A-21	TGGAGGCGAATTCAGCCTCC	Gênero “Scalindua”	Schmid <i>et al.</i> 2003
S*-Scabr-1114-a-A-2	CCCGCTGGTAACTAAAAACAAG	<i>Cand.</i> “S. brodae”	Schmid <i>et al.</i> 2003
S*-Amx-0368-a-A-18	CCTTTCGGGCATTGCGAA	Todos organismos <i>anamnox</i>	Schmid <i>et al.</i> 2003
S*-BS-820-a-A-22	TAATTCCCTCTACTTAGTGCC	<i>Cand.</i> “Scalidua wagneri” “S. sorokinii”	Kuypers <i>et al.</i> 2003

Em escala de bancada, experimentos mostraram que reatores *anamnox* são extremamente compactos e apresentam altas taxas de remoção (15 kg N/ m³ /dia). Devido à baixa velocidade de crescimento das bactérias *anamnox*, o tempo de partida dos reatores é muito longo; ou seja, de 100 a 150 dias. Portanto, a retenção do lodo é extremamente importante neste processo (Schmidt *et al.*, 2003).

DAPENA-MORA *et al.* (2004) utilizaram as seguintes configurações de reatores para avaliação do processo *anamnox*: *gas-lift* e reator seqüencial de batelada (RSB). O reator *gas-lift* foi inoculado com 0,36g SSV/L de lodo utilizado por STROUS *et al.* (1998). Após 200 dias de operação do reator *gas-lift* a carga aplicada de remoção de nitrogênio (nitrito e amônia) elevou de 0,42 a 2,0gN/L.dia para atividade *anamnox* de 1,15gN/gSSV.dia. A biomassa neste reator aumentou em 2,3gSSV/L. O RSB foi inoculado com 1,5g SSV/L de biomassa do reator *gas-lift*. Após 150 dias, ocorreu crescimento de biomassa atingindo valor de 2,5gSSV/L e a carga aplicada de remoção de nitrogênio elevou de 0,1 para 0,7gN/L.dia. Todavia, a atividade *anamnox* da biomassa desse reator

(0,65gN/gSSV.dia) foi menor do que aquela observada para o reator *gas-lift* (1,15gN/gSSV.dia).

KIELING *et al.* (2005) avaliaram a lavagem do lodo como estratégia para redução do tempo de partida de reatores *anammox*. Foi utilizado lodo de estação de tratamento de esgotos domésticos de Florianópolis para comparação de duas estratégias iniciais: enriquecimento em reator anaeróbio seqüencial de batelada (ASBR) operado como reator de mistura completa com taxa de diluição de $0,2\text{ d}^{-1}$ promovendo a lavagem de parte do lodo (RI) e com retenção celular total em RII (ASBR). As taxas de remoção de nitrogênio na última fase do experimento (310 a 380 dias) em RI e RII foram de 52% e 28% e carga nitrogenada total removida de 85mg-N/gSST.d e 6,08mg-N/gSST.d, respectivamente. Esses resultados, segundo os autores, indicaram que a retenção celular (como SST) não foi efetiva para remoção de nitrogênio. Ainda, neste estudo, utilizando a técnica de hibridização *in situ* (FISH) foram observados microrganismos *anammox*, somente, em RI após 225 dias de operação. No entanto, o processo *anammox* se estabeleceu, provavelmente, após 130 dias da partida do reator, segundo análises de remoção de nitrito e amônio.

REGINATTO *et al.* (2005) observaram em reator desnitrificante, operado com reator nitrificante para o tratamento de água residuária de suinocultura, a remoção de 50mgN-NH₄⁺/L.dia. A biomassa do reator desnitrificante foi utilizada com inóculo para operação de reator em batelada alimentado com meio específico para *anammox*. Nessa última condição a eficiência máxima de remoção foi de 95% para carga volumétrica de nitrogênio total de 33mg N_{total}/L.dia.

KARTAL *et al.* (2007) descreveram nova espécie de bactéria *anammox*, presente em reator em batelada seqüencial, com metabolismo diferente das anteriormente descritas. Essa nova espécie foi capaz de co-oxidar amônio e ácido propiônico, e provisoriamente denominada *Candidatus* “*Anammoxoglobus propionicus*”. Essa espécie apresentou velocidade específica de remoção de ácido propiônico de 0,64μmol/g proteína.min. Os autores realizaram experimento em batelada inoculado com 60% da cultura purificada de *Candidatus* “*B. anammoxidans*” e 40% da cultura enriquecida de *Candidatus* “*Anammoxoglobus propionicus*”, em meio com nitrito (1260mgN-NO₂⁻/dia), amônia (1260mgN-NH₄⁺/dia) e 1,095mg propionato/dia. Após 4 meses de operação a população da espécie heterotrófica (*Candidatus* “*Anammoxoglobus propionicus*”) apresentou 99% do total de células detectadas por análises de FISH.

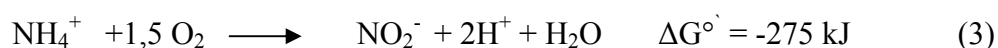
Este trabalho enriqueceu consórcios microbianos em quimiostatos utilizando-se dois inóculos diferentes. Técnicas tradicionais de microbiologia foram usadas para caracterizar

morfologicamente as células presentes nos dois quimiostatos. Técnicas de biologia molecular como FISH (Hibridação *in situ* com Sondas Fluorescentes) e reação em cadeia da polimerase e Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (PCR/DGGE), forneceram informações sobre a diversidade de microrganismos e análises filogenéticas. As cargas nitrogenadas aplicadas nos dois quimiostatos foram menores em relação a muitos trabalhos apresentados anteriormente, no entanto foram alcançadas remoções satisfatórias em ambos quimiostatos.

3.2. TECNOLOGIAS NÃO-CONVENCIONAIS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

Em ecossistemas naturais e antrópicos microrganismos nitrificantes amônio-oxidantes podem cooperar com bactérias *anammox* protegendo-as do oxigênio e provendo nitrito para oxidação anaeróbia da amônia. Essa é a base eco-fisiológica para aplicação tecnológica em dois processos: SHARON e CANON.

O processo Sharon (“Single reactor system for high ammonium removal over nitrite”) é técnica empregada para tratamento biológico de efluentes com elevadas cargas de nitrogênio. Neste processo, o amônio é parcialmente convertido a nitrito sob condições aeróbias por bactérias amônio-oxidantes (*Nitrosomonas* sp.), de acordo com a reação (3).



O processo Sharon está baseado em dois princípios: tempo de detenção hidráulica (TDH) de aproximadamente 1 dia e temperatura elevada (acima de 30°C). Nessas condições bactérias nitrito-oxidantes; tais como, *Nitrobacter* sp. e *Nitrospira* sp. são lavadas do reator. Por outro lado, o crescimento das bactérias amônio-oxidantes é favorecido.

A elevada temperatura e reduzido TDH atuam selecionando microrganismos amônio-oxidantes, uma vez que, a 35°C a velocidade máxima de crescimento (μ_{max}) das bactérias nitrito-oxidantes (0,5 d⁻¹) é aproximadamente a metade daquela observada para as bactérias amônio-oxidantes (1 d⁻¹) (VERSTRAETE & PHILIPS, 1998; JETTEN *et al.*, 2001b).

JETTEN *et al.* (2001b) estudaram a combinação dos processos SHARON e *anammox* para a remoção de nitrogênio. O reator utilizado para o processo SHARON foi alimentado com efluente de digestão de lodo com elevada concentração de amônio (1180mgN-NH₄⁺/L), operado a 35°C e TDH de 1, após alcançada estabilidade (20 dias) o

processo foi estável por mais de dois anos. O processo *anammox* foi realizado no reator sequencial de batelada (RSB) que recebeu como inóculo lodo enriquecido, previamente, sob condições *anammox*. O RSB foi alimentado com efluente do reator SHARON contendo 550mgN-NH₄⁺/L e 600mgN-NO₂⁻/dia. O processo *anammox* foi estabelecido sendo detectado mais de 80% de N₂ no *headspace*. Tais resultados indicaram que o processo Sharon-*anammox* pode ser utilizado para remoção de nitrogênio amoniacal com estabilidade.

No processo CANON (“Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrito”), amônio é parcialmente convertido a nitrito por bactérias amônio-oxidantes aeróbias sob condições limitantes de oxigênio e, em zonas anaeróbias (*eg.* interior do floco), bactérias *anammox* convertem nitrito produzido e amônio restante a nitrogênio gasoso com formação de nitrato, de acordo com as reações sequenciais 3 e 5. Para que ocorra o processo CANON é necessária a remoção total do oxigênio por bactérias amônio-oxidantes, uma vez que as células *anammox* são inibidas reversivelmente por baixos teores de oxigênio (0,5% da saturação).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ORGANOGRAMA EXPERIMENTAL

Dois inóculos foram enriquecidos, sob condições *anammox*, em quimiostatos com concentrações iniciais médias de 67,5mg N-NH₄⁺/l e 75,8mg N-NO₂⁻/l. Foram realizadas análises constantes de monitoramento conforme mostra a Figura 4.1. Amostras da biomassa dos quimiostatos, com 143 dias e 312 dias de operação, foram coletadas para confirmação da presença de microrganismos *anammox* utilizando a técnica FISH. Foi avaliada a diversidade microbiana por DGGE antes e após a purificação (separação por gradiente de densidade *Percoll*), e algumas bandas foram selecionadas para identificação por sequenciamento de fragmentos do DNA ribossomal 16S. A operação dos quimiostatos foi separada, experimentalmente definida, em cinco etapas conforme descrição apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Etapas de operação dos quimiostatos.

Etapa	Período (dias)	Condição
I	1-136	Afluente variável (dificuldade de determinação)
II	137-218	Primeiro período de estabilidade
III	219-232	Somente amônia afluente
IV	233-273	Instabilidade devido à nitrificação nas mangueiras
V	274-296	Segundo período de estabilidade

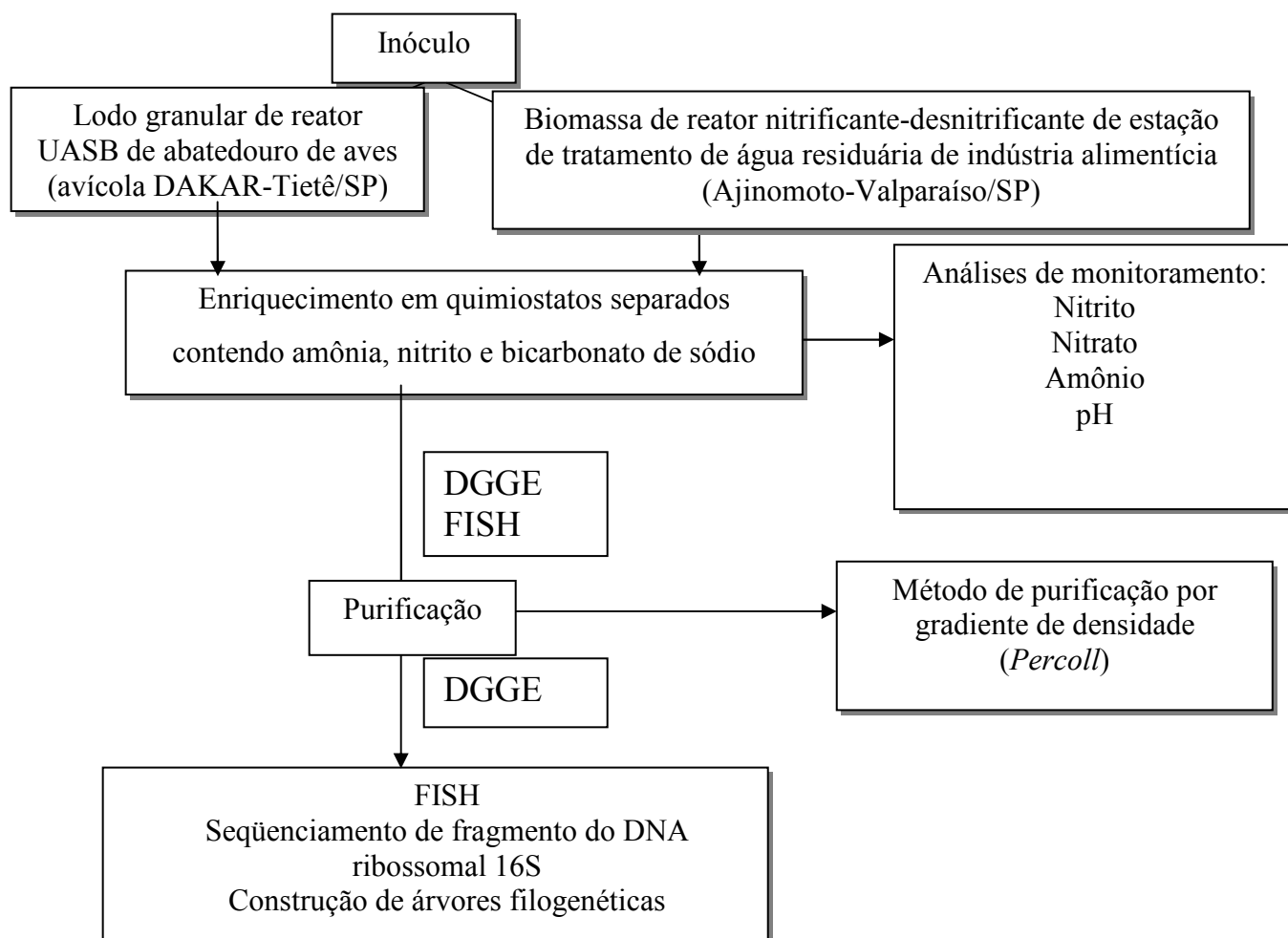


Figura 4.1. Organograma das etapas experimentais.

4.2. INÓCULO

Na preparação dos ensaios de enriquecimento nos quimiostatos *anammox* foram utilizados, separadamente, os seguintes inóculos: (Q1) 140 gramas de lodo granular úmido

(concentração do lodo igual a 68,52mg STV/g lodo úmido) proveniente de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (avícola DACAR-Tietê/SP) e (Q2) 140 gramas de biomassa úmida (concentração da biomassa igual a 22,74mg STV/g biomassa úmida) proveniente de reator nitrificante-desnitrificante, em escala de bancada, de indústria alimentícia (Ajinomoto-Valparaíso/SP).

4.3. ENRIQUECIMENTO

O enriquecimento é etapa fundamental no processo de adaptação dos inóculos à nova condição. Essa adaptação foi feita submetendo-se os inóculos a meio basal descrito por VAN DE GRAAF *et al.* (1996), contendo 5mM de amônia (70mg N-NH₄⁺/l), 5mM de nitrito (70mg N-NO₂⁻/l), 1000mg/l de bicarbonato de potássio, minerais e elementos traços. As concentrações de fosfato utilizadas na alimentação dos quimiostatos foram menores que 0,5mM. Os quimiostatos foram submetidos à atmosfera de Argônio (100%) para garantir condições anaeróbias. Todos os experimentos foram realizados sob temperatura de 37±1°C.

4.4 MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo adotado foi descrito por VAN DE GRAAF *et al.*, (1996) (Tabela 4.2). Ao meio basal foi adicionada solução de elementos traços (I e II) (Tabelas 4.3 e 4.4) como descrita pelos autores *op cit.* O selenito de sódio decahidratado (Na₂SeO₄·10H₂O) da solução original foi substituído por selenito de sódio (Na₂SeO₃), mantendo-se a quantidade de selênio adicionada ao meio. O frasco de alimentação contendo o meio de cultura foi autoclavado durante 20 minutos, a 121°C e 1 atm. Posteriormente, o frasco contendo o meio de cultura foi submetido à atmosfera de Argônio (100%), durante 20 minutos, sob condições de assepsia. Nesta fase, sob condições de assepsia foi adicionada a solução de cloreto de cálcio e sulfato de magnésio, previamente, esterilizados separadamente. Em todos os ensaios o pH do meio foi ajustado em 8.

Tabela 4.2. Composição do meio basal de cultivo.

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
(NH ₄) ₂ SO ₄	330 mg (5mM)
NaNO ₂	345mg (5mM)
KHCO ₃	500 mg
KH ₂ PO ₄	27,2mg
MgSO ₄ . 7H ₂ O	300mg
CaCl ₂ . 2H ₂ O	180mg
Solução traço I	1ml
Solução traço II	1ml

Fonte: VAN DE GRAAF *et al.*, (1996)

Tabela 4.3. Composição da Solução Traço I.

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
EDTA	5g
FeSO ₄	5g

Fonte: VAN DE GRAAF *et al.*, (1996)

Tabela 4.4. Composição da Solução Traço II.

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000mL de água ultrapurificada
EDTA	15g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,43g
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,24g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,99g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,25g
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,22g
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,19g
Na ₂ SeO ₃	0,09g
H ₃ BO ₃	0,014g

Fonte: Adaptado de VAN DE GRAAF *et al.*, (1996).

4.5. OPERAÇÃO DOS QUIMIOSTATOS ANAMMOX

Foram utilizados quimiostatos com volume de 2000mL (Figura 4.2) para enriquecimento dos lodos. O *headspace* de 25% foi preenchido com Argônio (100%), 210mL de pérolas de vidro e 1540mL de volume útil (meio de cultivo + lodo).

O enriquecimento foi realizado com a finalidade de obter elevada concentração de

biomassa *anammox*. A vazão afluente nos quimiostatos foi de 18ml/h. TOH *et. al.*, (2002) utilizaram faixa de 12 a 25mL/h e tempo de detenção hidráulica (TDH) de 85,5 horas. Esta reduzida vazão deve se ao elevado tempo de geração das bactérias *anammox*, o qual oscila entre 11-29 dias (Strous *et al.*, 1998).

Os quimiostatos foram confeccionados em boro silicato com 2mm de espessura e tampas em teflon. Os dois quimiostatos receberam meio sintético bombeado do frasco de alimentação mantido a 4°C para se evitar a mudança do bicarbonato para a fase gasosa. A vazão afluente refletiu carga de nitrogênio de 60,48mg (N- NO₂⁻ + N- NH₄⁺)/dia. Os quimiostatos foram colocados em estufa com temperatura controlada a 37±1°C.

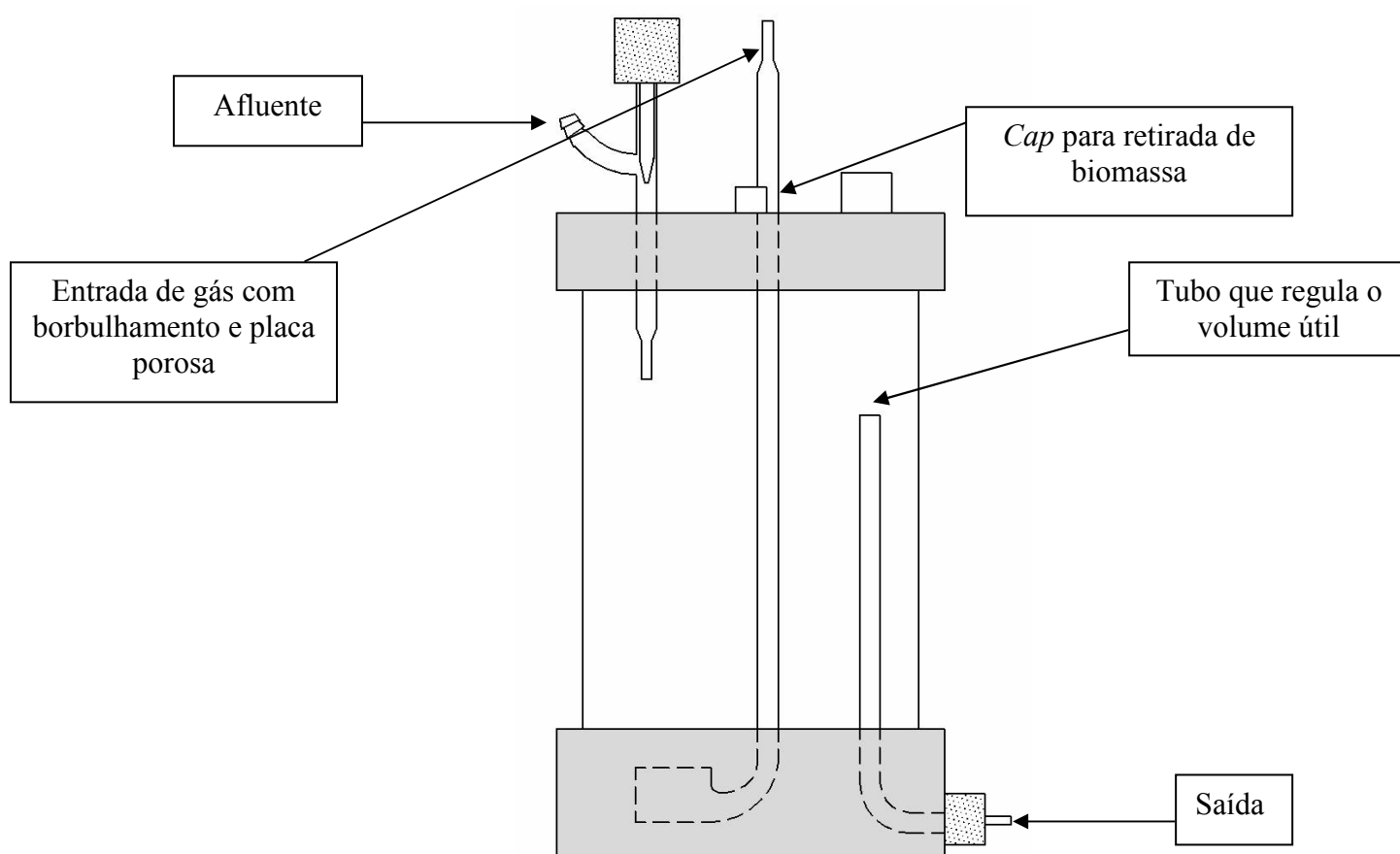


Figura 4.2. Esquema do quimiostato.

Como material suporte para imobilização da biomassa foram usadas pérolas de vidro com diâmetro entre 2 e 4mm. As pérolas foram transferidas para Becker de polipropileno e durante 30 minutos e mergulhadas em solução 10% de ácido fluorídrico. A cada 5 minutos as perolas eram revolvidas com tubo de PVC, com finalidade de favorecer o contato com o ácido e, conseqüentemente, aumentar a rugosidade para imobilização celular (Figura 4.3).

Após o ataque ácido, as pérolas foram lavadas várias vezes com água de torneira e destilada, transferidas para estufa de secagem e, então colocadas para imobilização.

Os inóculos foram homogeneizados separadamente em liquidificador doméstico e transferidos para cada quimiostato visando à imobilização nas pérolas de vidro. Imediatamente após a transferência dos inóculos para os quimiostatos foi iniciado o enchimento e a alimentação na vazão descrita acima.

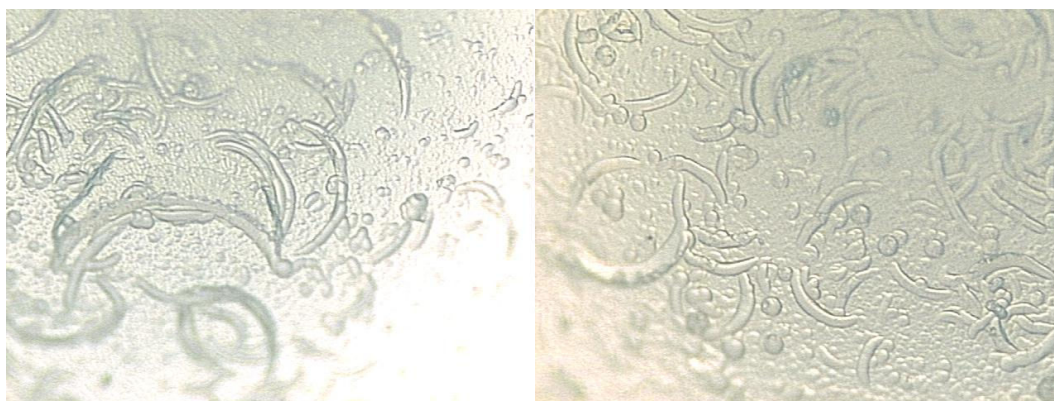


Figura 4.3. Microscopia óptica de campo claro da superfície das pérolas de vidro após ataque de ácido fluorídrico (aumento de 100 vezes).

4.6. EXAMES MICROSCÓPICOS

Exames microscópicos foram realizados em microscopia óptica comum, de contraste de fase e epifluorescência utilizando Microscópio Olympus BX60, acoplado a câmera com captura de imagem e software Image-Pro Plus. A partir do 109º dia de operação, as amostras coletadas do quimiostatos foram transferidas para frascos de antibióticos com pérolas de vidro e agitadas para desprendimento do biofilme, visando melhorar a visualização das células.

Exames utilizando técnica de coloração de Gram foram realizados segundo DSM (1991).

4.7. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises de amônia, nitrato e nitrito foram realizadas segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998), duas vezes por semana. A partir de 116 dias de operação as análises foram feitas por análise por injeção em fluxo (FIA) proposto pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998).

A determinação dos sólidos totais voláteis foi realizada no início e final da operação dos quimiostatos de acordo com metodologia do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998).

O pH e potencial REDOX foram analisados utilizando aparelho Digimed modelo DM-21. Foi utilizado eletrodo combinado de platina Pt4805 da Mettler-Toledo. O pH foi analisado toda vez que meio de cultivo fresco foi submetido à alimentação. O potencial redox foi medido uma vez por semana.

4.8. PURIFICAÇÃO

Métodos de purificação tradicionais falharam para culturas *anammox*. Desse modo, os ensaios de purificação foram feitos de acordo com protocolo utilizado por STROUS *et al.* (1999a). Esse protocolo consiste na desagregação do biofilme por banho ultrassônico, separação das células dos fragmentos do biofilme e purificação celular usando gradiente de densidade por centrifugação *Percoll* (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Protocolo de purificação da cultura *anammox*.

Etapas da purificação
1. O biofilme foi lavado em 40mL de tampão HEPES/bicarbonato (70/10 mM e pH 7,8).
2. Após a lavagem, o material foi transferido para banho de ultra-som em porções de 5mL durante 1 minuto e 30 segundos (biomassa imobilizada) e potência de 50W.
3. A amostra foi transferida para frasco apropriado e procedeu-se a centrifugação durante 5 minutos a 10.000g. Foram observados gradiente de coloração constituído pelo sobrenadante laranja com fragmentos do biofilme e <i>pellet</i> avermelhado contendo as células separadas.
4. O <i>pellet</i> foi lavado com solução HEPES/bicarbonato (70/10 mM e pH 7,8). A amostra foi purificada usando centrifugação <i>Percoll</i> , sendo 6,9mL de <i>Percoll</i> (Pharmacia) e 3,1ml de suspensão celular. A amostra foi submetida a centrifugação durante 60 minutos a 10.000g e 5°C.
5. A banda vermelha formada na região inferior do frasco de centrifugação foi retirada e submetida à lavagem com o tampão estéril.

Fonte: Adaptado de STROUS *et al.*, 1999.

4.9. TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

4.9.1. Hibridação *in situ* com Sondas Fluorescentes

A sonda utilizada para confirmação do consórcio *anammox* foi a S^{*}-Amx-0368-a-A-18 descrita por SCHMID *et al.* (2003). Esta sonda é a mais abrangente e hibridiza todos os organismos *anammox* descritos até a presente data. As amostras foram coradas com DAPI e hibridadas com a sonda Amx 368.

As amostras foram lavadas em PBS duas vezes. A fixação das amostras foi realizada em tampão de fixação, contendo solução PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, Tampão Fosfato Salino, 75,985g NaCl/L, 9,9372g Na₂HPO₄/L e 3,5994g NaH₂PO₄/L pH=7,2) e 4%(v/v) de

paraformaldeído durante 14 horas a 4°C. Após a fixação procedeu-se a lavagem e centrifugação (9000rpm a 4°C) da amostra em tampão PBS, por 3 vezes. O *pellet* foi ressuspenso em 500µL de etanol e 500µL de PBS. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

Cinco microlitros, de cada amostra fixada, foram colocados em cada pocinho da lâmina de hibridação recoberta com gelatina, secos durante 20min. à 45°C e desidratados em soluções 50, 80 e 100% de etanol, três minutos cada solução.

A hibridação e lavagem foram conduzidas segundo Tabela 4.6 utilizando protocolo descrito por EGLI *et al.* (2003) (Figura 4.4). As células hibridadas foram visualizadas em microscópio OLIMPUS BX 60 com filtro WG. Para coloração com DAPI foi utilizado filtro WU.

Tabela 4.6. Soluções Tampão de hibridação e lavagem utilizadas na técnica FISH.

Sonda	Tampão de Hibridação	Tampão de Lavagem
	0,9M NaCl	338mM NaCl
	20mM Tris-HCl (pH=7,2)	20mM Tris-HCl (pH=7,2)
S ⁻ -Amx-0368-a-A-18	0,01% SDS	0,01% SDS
	10mM EDTA	5mM EDTA
	15% (v/v) Formamida	
Tempo e temperatura	90min. 46°C	10min. 48°C

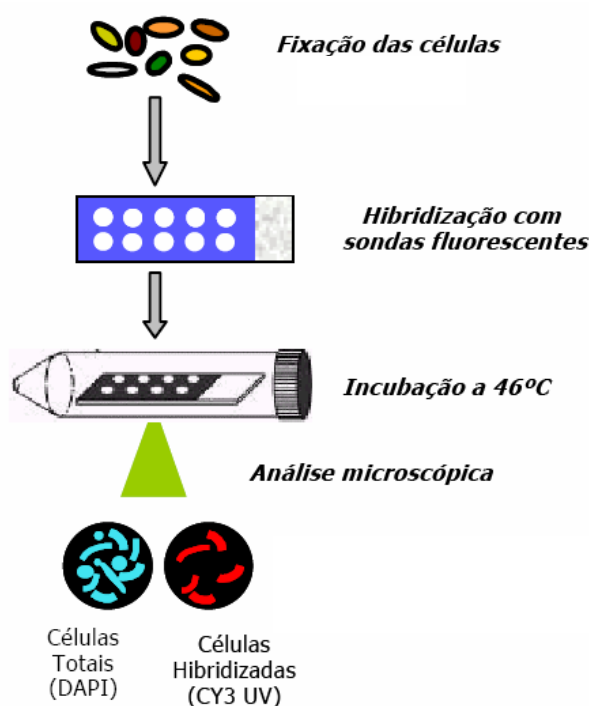


Figura 4.4. Representação esquemática do FISH. Fonte: Adaptado de KIELING (2004).

4.9.2. Análises da Diversidade dos Consórcios Microbianos

A análise dos consórcios microbianos presentes nos dois quimiostatos foi realizada utilizando técnica de reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR/DGGE), conforme Figura 4.5.

A extração de DNA foi realizada através do método direto, utilizando “*glass beads*” e mistura de fenol: clorofórmio:tampão fosfato salino (1:1:1 v/v), seguindo o procedimento descrito por MELVIN & HOBSON (1994) (Tabela 4.7).

As amostras de DNA obtidas pelo protocolo de extração foram visualizadas em gel de agarose 1% , corados com brometo de etídio e observadas em fotodocumentador Eagle Eye TM III (Stratagene) acoplado ao computador e *software* Eagle Slight para visualização de bandas, sob exposição à UV (254nm).

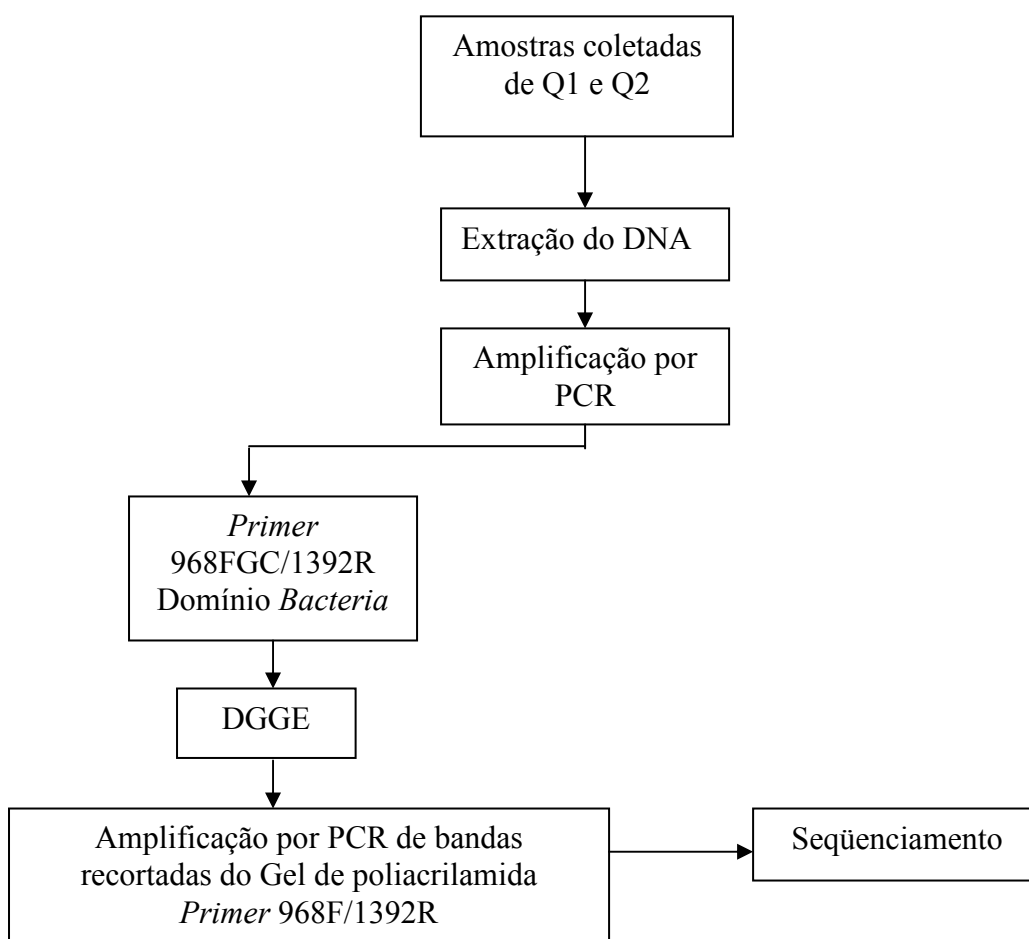


Figura 4.5. Fluxograma da análise dos consórcios microbianos presentes em Q1 e Q2 utilizando técnica PCR/DGGE.

Tabela 4.7. Protocolo de extração de DNA.

<i>Passo</i>	<i>Procedimento</i>
1	5ml da amostra foi transferida para tubos Falcon (15 mL) e submetidas a centrifugação por 10 minutos, a 6000 rpm e temperatura de 4°C;
2	O sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido a lavagem com tampão PBS 1X em centrífuga por 10 minutos a 6000 rpm e temperatura de 4°C;
3	O sobrenadante foi descartado;
4	Ao precipitado foi adicionado os seguintes materiais: 0,5 g de <i>Glass Beads</i> (150-212 µm), 1 mL de fenol tamponado (equilibrado com Tris), 1 mL de clorofórmio e 1 mL de PBS (1X), a partir deste momento os tubos com amostras sempre foram mantidos em gelo;
5	As amostras foram agitadas no vórtex;
6	Foi feita uma seqüência de extração de DNA para descobrir o melhor tempo de extração. Os tempos considerados foram os seguintes: 20, 40, 60, 80, 100 e 120 segundos. O melhor tempo de extração encontrado foi de sessenta segundos;
7	As amostras foram submetidas a centrifugação por 10 minutos, a 6000 rpm e temperatura de 4°C;
8	A camada líquida (< 1 mL) foi removida e transferida para tubo <i>ependorf</i> (2mL);
9	Solução tamponada de fenol (1,0 mL) foi adicionada e submetida a agitação no vórtex. O material foi centrifugado por 10 minutos, a 10000 rpm e temperatura de 4°C.
10	O sobrenadante foi transferido para outro tubo, no qual foi adicionado 1,0 mL de clorofórmio. Procedeu-se a agitação no vórtex e centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm e temperatura de 4°C;
11	O passo anterior foi repetido;
12	A camada superior (DNA) foi transferida para frasco apropriado e mantida a -20°C.

4.9.3. Reação em Cadeia da Polimerase e Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (PCR/DGGE)

A amplificação dos fragmentos de DNA ribossomal 16S foi realizada utilizando-se *primers* universais para o Domínio *Bacteria*. Os produtos de PCR com *primers* universais foram separados por Eletroforese em Gel por Gradiente Desnaturante (DGGE), que separa iguais fragmentos de DNA pela concentração de G+C no fragmento amplificada, então fragmentos com maior quantidade de G+C situam-se na região do gel onde tem maior concentração de desnaturante (formamida e uréia).

Cada reação de amplificação do DNAr 16S foi realizada utilizando as seguintes soluções: 0,5µL “Taq DNA polimerase Platinum” (5U/µL), 5µL de tampão PCR 10X, 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 5µL de dNTPs (2mM de cada uma), 0,5µL de “*primer forward*” (100pmol) , 0,5µL de “*primer reverse*” (100pmol) e 2µL de DNA extraído. O volume final de reação foi 50µL completado com água estéril livre de nuclease PROMEGA. Para reação de amplificação foi usado Kit de reação “Platinum” (Invitrogen). A amplificação foi realizada em termociclador “Gene Amp. PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.).

O seqüenciamento foi feito a partir das bandas recortadas do DGGE com fragmentos de DNA amplificados pelos *primers* conforme Tabela 4.8. Para seqüenciamento, as bandas recortadas do gel de poliacrilamida foram imersas em água estéril livre de nuclease a 4°C durante 48h para eluição do DNA em água. Essa água com DNA eluído foi utilizada para nova amplificação com mesmos *primers*, porém sem GC *clamp*. Esse produto de PCR foi purificado, para se retirar resíduos de dNTPs, enzimas, e *primers*, utilizando Kit *UltraClean*TM *PCR Clean-up* (MoBio Laboratories, Inc. CA) conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA purificadas foram seqüenciadas em seqüenciador automático ABI PRISM 310.

Tabela 4.8. *Primers* utilizados para DGGE.

<i>Primers</i>	Grupo	Seqüência (5' → 3')	Referência
968FGC		AACCGCGAAGAACCTTAC	
GC <i>clamp</i>	Domínio <i>Bacteria</i>	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGG GGCGGGGGCACGGGGGG	Nielsen <i>et al.</i> (1999).
1392R		CCTTTCGGGCATTGCGAA	

As seqüências obtidas foram agregadas e averiguadas usando *DNASTAR-package Software* (Lasergene Sequence Analysis). Após averiguação, as seqüências de nucleotídeo foram comparadas com seqüências do banco de dados eletrônico NCBI-database para a aproximação por similaridade.

As seqüências com maior similaridade genética foram agrupadas e alinhadas aos pares e multiplamente em *software* ClustalW versão 1.83 para Linux em processador Pentium 4 Northwood com 2.0 Ghz de *clock* e 1Gb de *RAM*. Depois de alinhadas as seqüências foram arranjadas em forma de árvore filogenética utilizando-se método de máxima verossimilhança em *software* PHYLIP 3.61 com *Bootstrap* de 150 reamostragens.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS CONSÓCIOS ENRIQUECIDOS

No consórcio enriquecido no quimiostato Q1 (inóculo - lodo de reator UASB de abatedouro de aves) a maioria das células estava aderida ao polímero de biofilme, dificultando a visualização. Raras células eram encontradas em suspensão (planctônicas). Foram observadas morfologias variadas, tais como bacilos pleomórficos, provavelmente devido a adaptação às novas condições presentes no quimiostato, bacilos (Figura 5.1), cocos agrupados (Figura 5.2a e 5.3a), filamentos (Figura 5.2b) e coco-bacilos e cocos em matriz extracelular (Figura 5.3b).



Figura 5.1. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q1 após 70 dias de operação.

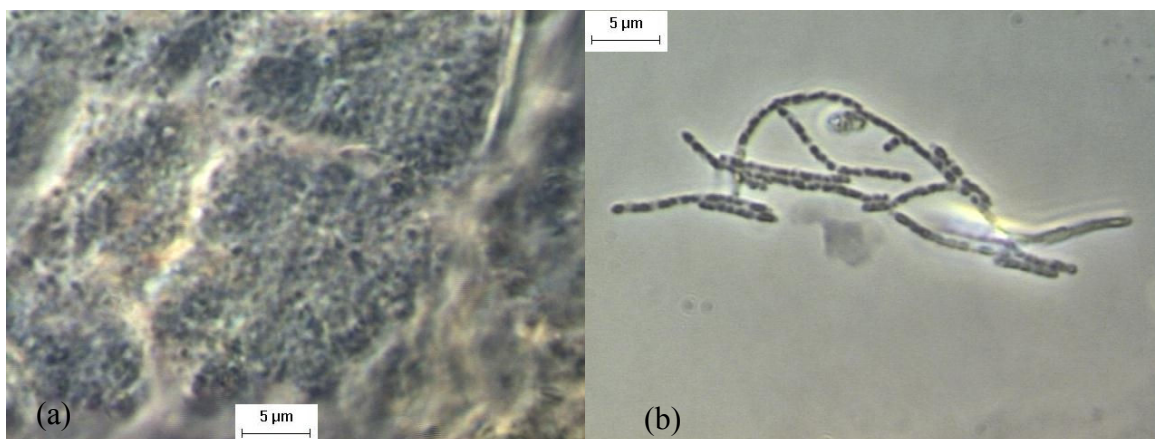


Figura 5.2. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q1 após 105 dias: (a) cocos agrupados; (b) filamentos.

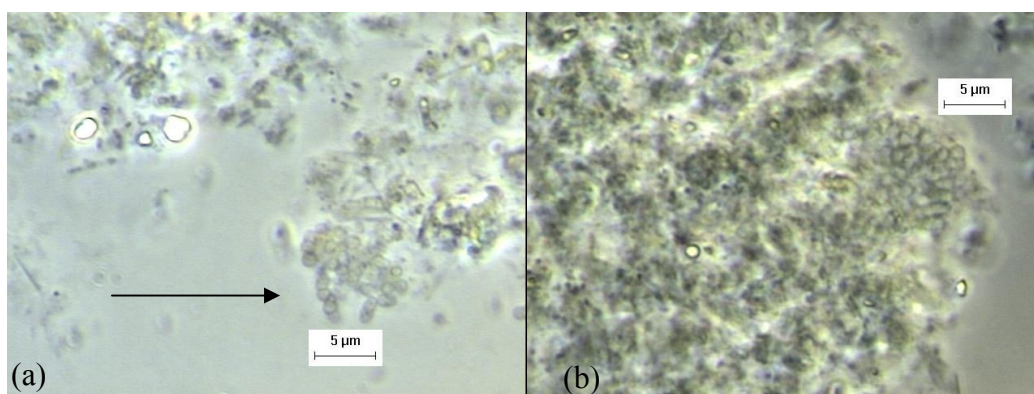


Figura 5.3. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q1 após 105 dias: (a) cocos agrupados; (b) coco-bacilos e cocos em matriz extracelular.

Nos exames microscópicos mostrados nas Figuras 5.1 a 5.3, a biomassa foi observada sem nenhum tratamento prévio para desprender as células do biofilme. A Figura 5.4 mostra a biomassa presente em Q1, após desprendimento do biofilme, com predomínio de aglomerados celulares de cocos envoltos por matriz extracelular, assim como descrito por EGLI *et al.* (2001) e Schmid *et al.* (2000). Os aglomerados envolvidos por matriz extracelular encontrado por EGLI *et al.* (2001) tinham diâmetro médio de 17µm, enquanto os encontrados em Q1 tinham diâmetro variando de 10 a 15µm. Na Figura 5.4a, observa-se esta matriz extracelular rompida, e novos aglomerados se formando (Figura 5.4b). Foram encontrados, também, filamentos (Figura 5.4c) após 109 dias de operação.

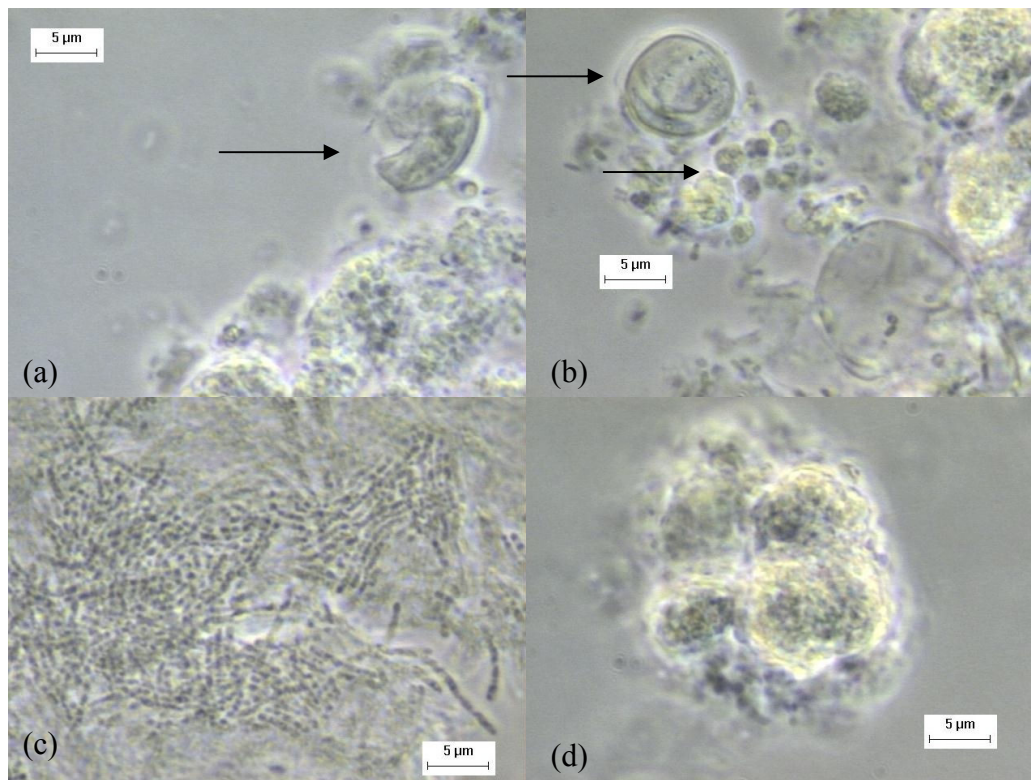


Figura 5.4. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q1 após 109 dias: (a) matriz extracelular rompida; (b) novos aglomerados se formando; (c) filamentos; (d) cocos aglomerados.

Após 148 dias de operação do Q1 foi realizado exame microscópico para coloração de Gram. A maioria das células observadas eram Gram negativas, com alguns bacilos Gram positivos (Figura 5.5a e 5.5d). As Figuras 5.5a, 5.5b e 5.5c revelam que o aglomerado de cocos foi Gram negativo, semelhante ao observado por STROUS *et al.* (2006) para bactérias *anammox* da ordem *Planctomycetales*.

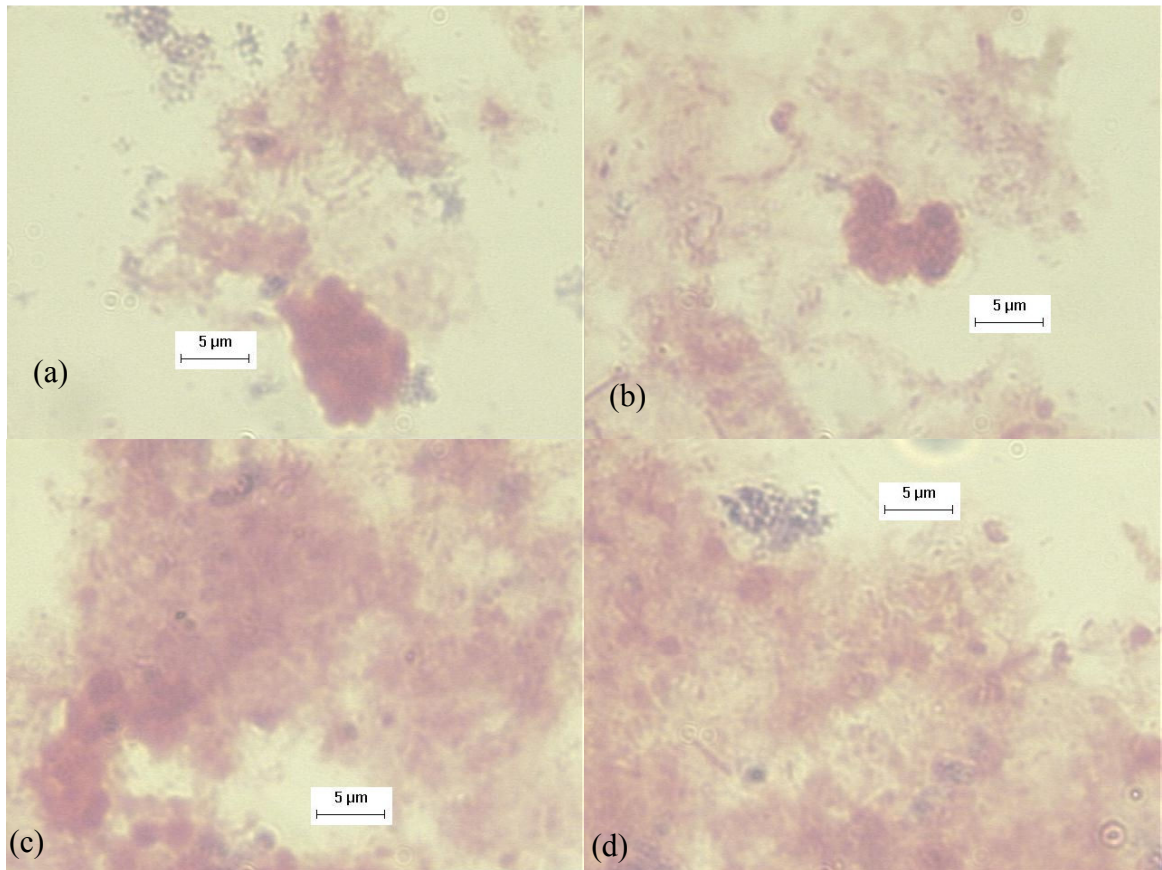


Figura 6.5. Coloração de Gram em microscopia de campo claro da biomassa crescida em Q1 após 148 dias.

O consórcio enriquecido em Q2 (inoculo – biomassa de reator nitrificante – desnitrificante de indústria alimentícia) apresentou morfologias variadas. Os primeiros exames microscópicos foram realizados com 70 dias de operação. A visualização das células foi difícil, assim como em Q1, porém havia muito *debris* celulares e as mesmas encontravam-se agregadas (Figura 5.6 e 5.7c). Neste período, ainda ocorria lavagem do lodo. A Figura 5.7 mostra morfologias tais como: bacilos pleomórficos (Figura 5.6a) e bacilos, cocos e filamentos (Figura 5.7b), e aglomerado de cocos (Figura 5.7d). Nas amostras retiradas de Q2 com 70 e 105 dias de operação, foram visualizadas raras células (Figuras 5.6 e 5.7). Para estas microfotografias, foi necessário percorrer muitos campos de visualização na lâmina contendo amostra.

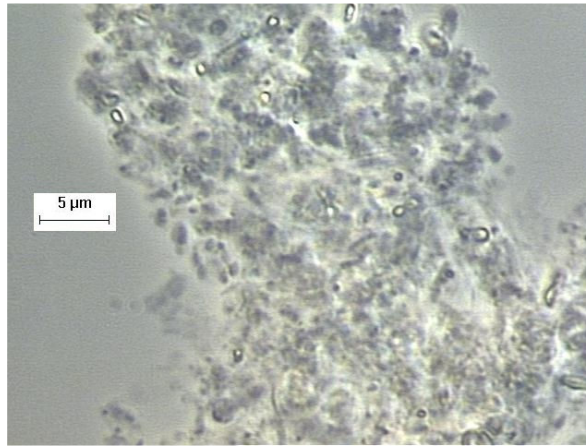


Figura 5.6. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q2 após 70 dias de operação.

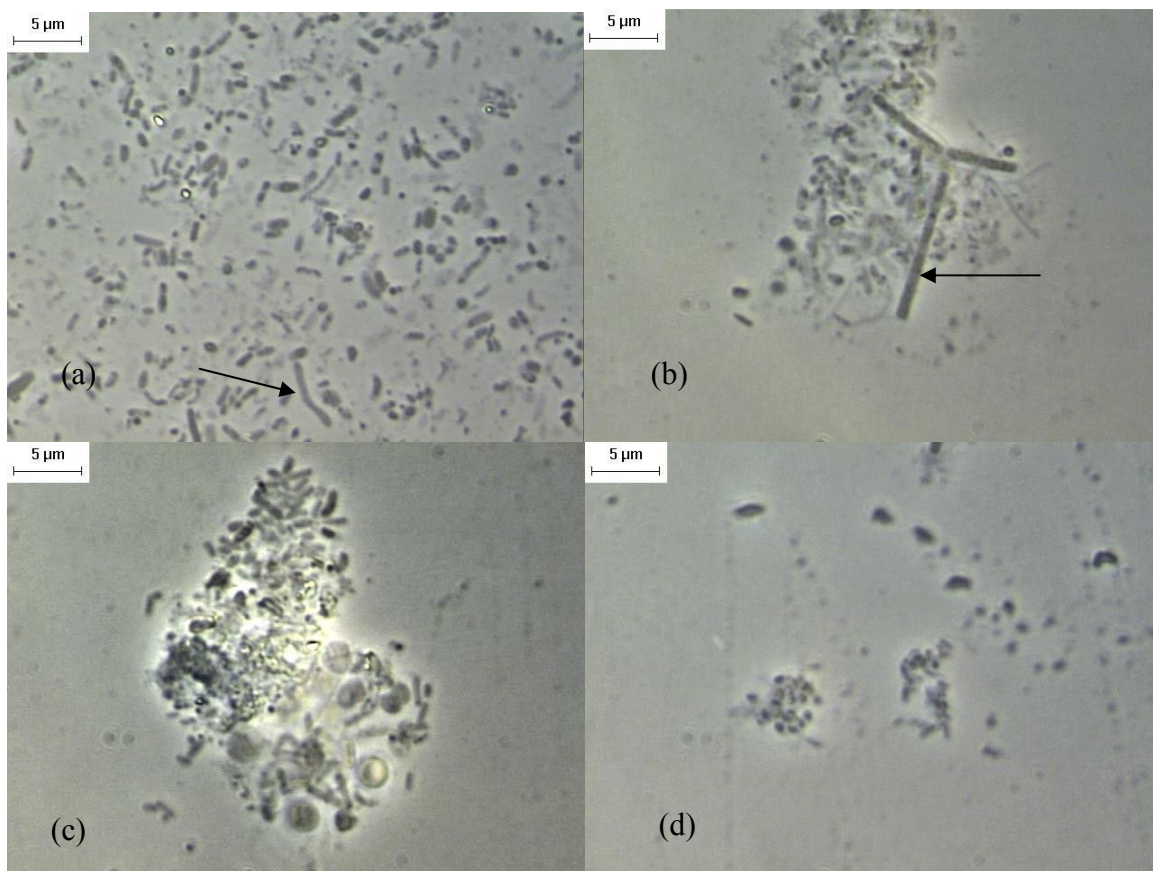


Figura 5.7. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q2 após 105 dias: (a) bacilos pleomórficos; (b) filamentos; (c) biofilme de células aglomeradas; (d) cocos agrupados.

As Figuras 5.8 e 5.9a mostram a biomassa presente no quimiostato 2, após 109 dias de operação. Após desprendimento do biofilme, como descrito anteriormente, observou-se predomínio da mesma morfologia encontrada em Q1. A Figura 5.9b revela células suspensas (sem matriz extracelular). Vale a pena ressaltar que estes aglomerados celulares, com diâmetro variando de 10 a 30 μ m, visualizados após o desprendimento celular do biofilme, estavam presentes nas amostras anteriores, todavia, camuflados pelo biofilme.

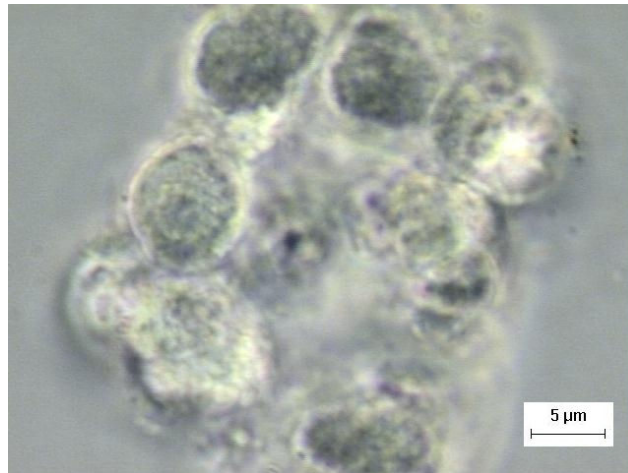


Figura 5.8. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q2 após 109 dias.

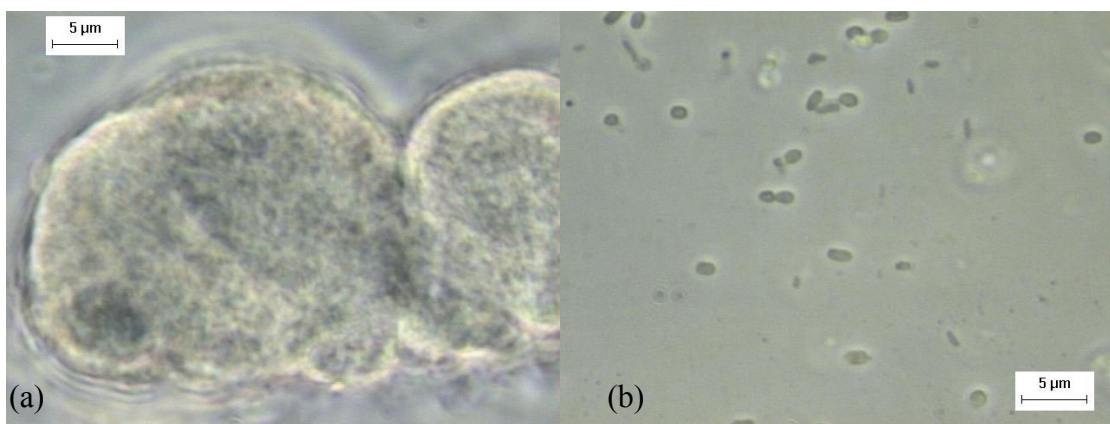


Figura 5.9. Microscopia de contraste de fase da biomassa crescida em Q2 após 109 dias: (a) cocos aglomerados; (b) cocos e coco-bacilos suspensos.

Exame de microscopia de campo claro, com a biomassa submetida à coloração de Gram, revelou aglomerados de cocos Gram negativos, além de cocos e bacilos Gram positivos (Figura 5.10b).

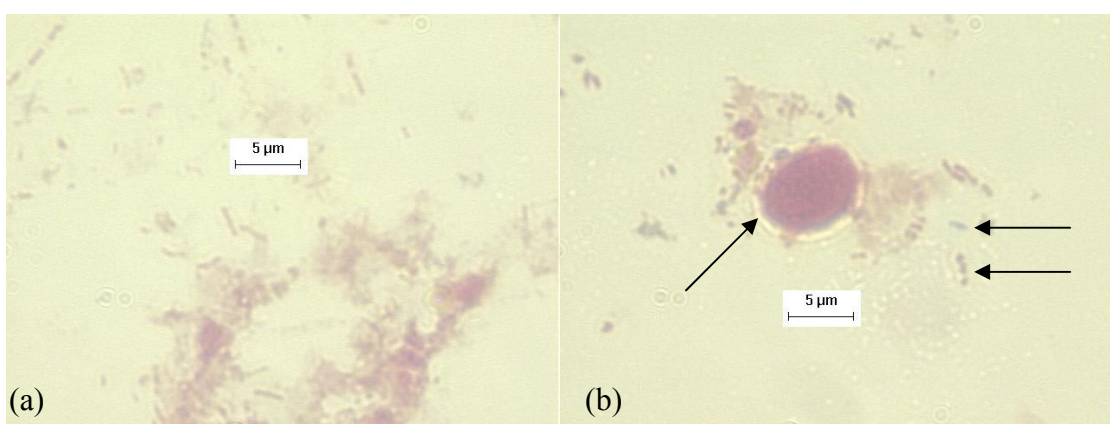


Figura 5.10. Coloração de Gram em microscopia de campo claro da biomassa crescida em Q2 após 148 dias: (a) células planctônicas Gram negativas; (b) aglomerado de cocos Gram negativos e bacilos Gram positivos.

5.2. OPERAÇÃO DOS QUIMIOSTATOS

Durante os primeiros 17 dias de operação não foi realizada nenhuma análise no efluente dos quimiostatos, pois os dois efluentes (de Q1 e de Q2) eram constituídos por elevada concentração de sólidos suspensos devido ao arraste de lodo biológico.

As concentrações inicial e final em cada quimiostato estão expostas na Tabela 5.1. Os resultados indicaram que tanto no Q1 quanto no Q2 ocorreu diminuição das concentrações de sólidos. No entanto, Q1 teve maior perda de biomassa (48%) que Q2, com perda de aproximadamente 28% da biomassa inicial. As condições usadas na alimentação dos quimiostatos foram altamente seletivas, pois mesmo após 316 dias de operação a concentração da biomassa nos quimiostatos não se elevou.

Tabela 5.1. Concentração da biomassa como STV nos quimiostatos.

Quimiostato	Concentração inicial no quimiostato (gSTV/L)	Concentração final no quimiostato (gSTV/L)
1	6,22	3,23
2	2,06	1,48

Os valores de pH obtidos nos efluentes dos quimiostatos mantiveram-se na faixa de 7,5 a 8,9. Muitas vezes o pH efluente era maior que o afluente. O pH afluente sempre esteve entre 7,8 e 8,1

O potencial redox, analisado no meio reacional (dentro do quimiostato) esteve sempre na faixa de -18 a +127mv. Esta faixa de potencial redox é anóxica devida à presença de nitrito afluente. É importante salientar que os quimiostatos se mantiveram sempre com concentração de oxigênio dissolvido igual a zero, mantendo condições favoráveis à *anammox*.

5.2.1. REMOÇÃO DO NITROGÊNIO AMONIAICAL

A concentração afluente de amônia se mostrou bastante variável na etapa I, principalmente até o dia 91 de operação (seta na Figura 5.11). No entanto, constata-se que mesmo com a oscilação na concentração afluente, tanto em Q1 quanto Q2, mantiveram-se com as mesmas eficiências de remoção.

O quimiostato Q2 apesar de ter menor concentração inicial de biomassa (2,06gSTV/L) apresentou remoção média ligeiramente maior que Q1 (6,22gSTV/L), na

etapa II (período entre 136 e 218 dias de operação), com valores de $29,9 \pm 5,1\%$ e $29,4 \pm 5,0\%$, respectivamente, para concentração afluente média de $65,9 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$. Neste período os quimiostatos operaram com estabilidade.

Na etapa III (entre os dias 219 e 232), os quimiostatos foram alimentados com afluente contendo somente nitrogênio amoniacal para verificar se a remoção que estava ocorrendo era devido ao *stripping* da amônia livre. A remoção de nitrogênio, durante esse período, em Q1 variou de 3,7 a $11,7 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$, e em Q2 a faixa de remoção foi entre 4,5 e $10,5 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$, para concentração afluente média de $67,1 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$. Em ambos os casos a remoção foi aquém da observada anteriormente.

A remoção do N-NH_4^+ foi de origem biológica, uma vez que, em pH igual a 8 e 37°C (condições de operação nos quimiostatos), a concentração teórica máxima possível de amônia livre (N-NH_3) é de $6,31 \text{ mg/L}$. Esse valor está na faixa de remoção observada quando os quimiostatos foram alimentados somente com amônia, portanto o *stripping* da amônia foi descartado como principal processo de remoção.

Na etapa IV, principalmente entre os dias 236 e 247, além dos quimiostatos se recuperarem da ausência de nitrito afluente, começou a ocorrer nitrificação nas mangueiras de alimentação. Esse fato se observou a partir do dia 243, quando constatou-se nitrato afluente nos quimiostatos. Nesse período, as concentrações de nitrito afluente estiveram elevadas, alcançando valores de até a $111,9 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$.

Nos dias 243 e 247 as concentrações dos compostos nitrogenados foram analisadas em amostras coletadas do frasco de alimentação e na entrada dos quimiostatos demonstrando que o processo de nitrificação realmente estava ocorrendo.

Na Tabela 5.2 estão expostos os valores do nitrogênio nitrificado calculados de duas maneiras: (1) pela redução da concentração da amônia na entrada em relação ao frasco, e (2) pelo aumento do nitrito na entrada em relação ao frasco somado ao nitrato na entrada do quimiostato. Os valores foram muito próximos indicando que, realmente, estava ocorrendo nitrificação. Para solucionar o problema trocou-se a mangueira de silicone por mangueiras de PVC flexível impermeável à atmosfera.

Na etapa V de operação (entre os dias 274 e 296) verificou-se, novamente, estabilidade do processo. No entanto, ocorreu inversão das eficiências de remoção da amônia. O quimiostato Q1 apresentou maior eficiência de remoção de N-NH_4^+ que Q2, com valores, respectivamente de $51,6 \pm 13,1\%$ e $39,3 \pm 14,4\%$, para concentração afluente média de $80 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}$. Todos os valores das concentrações de amônia afluente e efluente Q1 e Q2 durante o período de operação estão na Tabela 1 (Anexo).

Tabela 5.2. Análises dos compostos nitrogenados no frasco de alimentação e no afluente dos quimiostatos.

Operação (dias)	Frasco de alimentação			Afluente dos quimiostatos			Nitrogênio nitrificado (diminuição da amônia) (mg/L)	Nitrogênio nitrificado (aumento do nitrito + nitrato) (mg/L)
	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	N-NO ₃ ⁻ (mg/L)		
243	95,4	78,8	0	67,3	105,1	6,1	22,72	32,4
247	83,02	68,48	0	27,4	111,9	11,63	55,6	55,05
252*	89,54	75,14	0	85,59	75,05	0	3,95	0,09

* analisado após troca das mangueiras, não se verificando mais nitrificação.

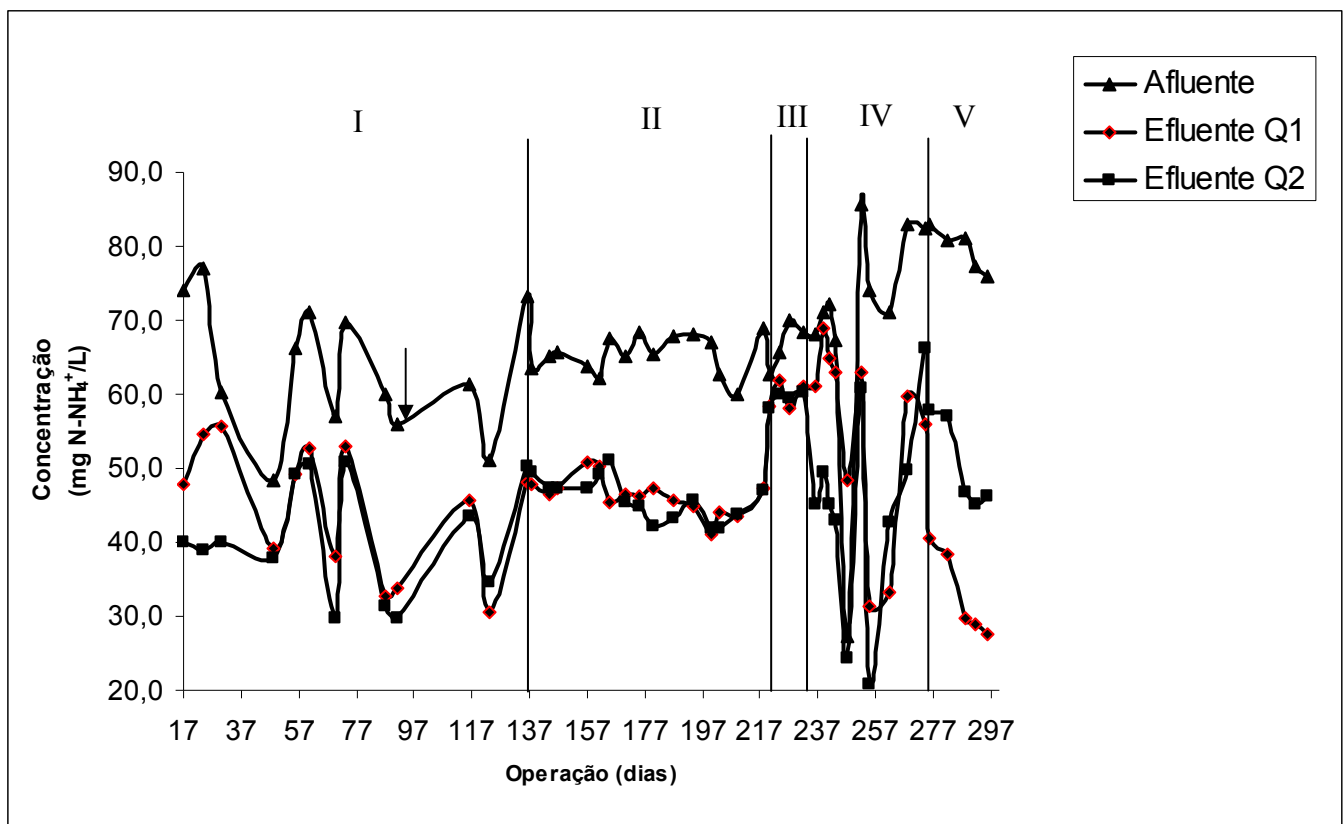


Figura 5.11. Variação temporal da concentração de nitrogênio na forma de amônia afluente e efluente em Q1 e Q2.

Após 120 dias de operação, a biomassa presente em Q1 mostrou-se granulada (Figura 5.12). Porém os grânulos apresentaram estrutura frágil e de fácil rompimento. No mesmo período a biomassa de Q2 apresentou-se floculenta.

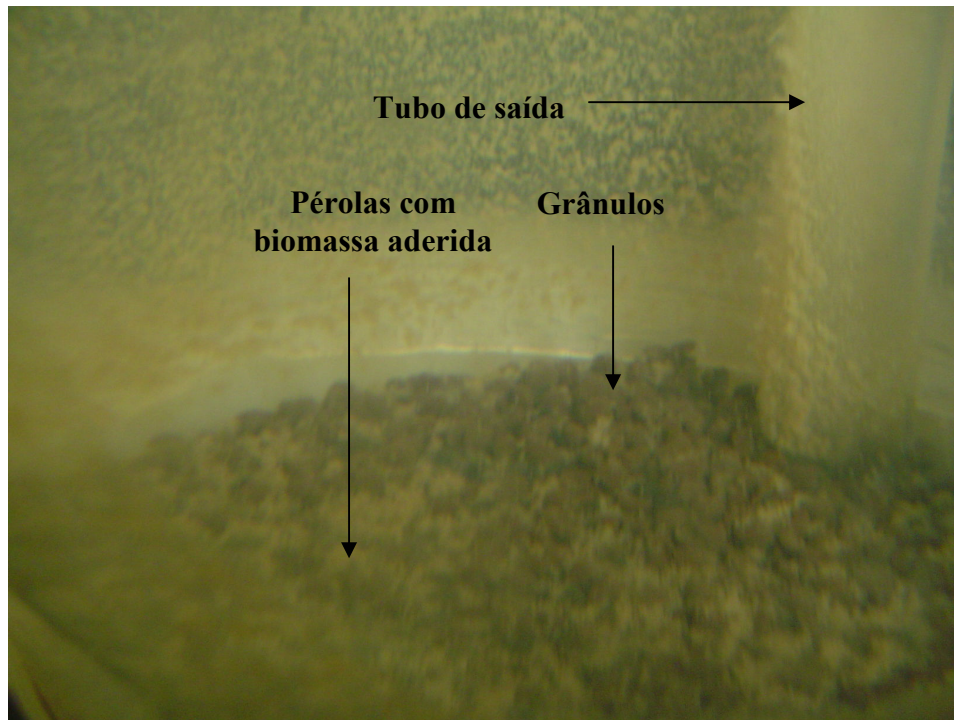


Figura 5.12. Foto da parte inferior de Q1 mostrando pérolas imobilizadas, grânulos de biomassa e tubo de saída.

5.2.2. REMOÇÃO DO NITROGÊNIO NA FORMA DE NITRITO E PRODUÇÃO DE NITRATO

Inicialmente, a concentração de nitrito efluente de Q1 era menor que afluente, provavelmente devido à desnitrificação endógena em função do meio de cultivo utilizado na alimentação ser autotrófico. Portanto, células morreram e serviram como fonte de carbono para este processo. Em Q2 este processo de desnitrificação endógena foi mais rápido provavelmente devido à menor concentração de biomassa inicial; ou seja, 2,06mg STV/L em Q2 em relação a 6,22mg STV/L em Q1.

A partir do 48º dia a análise das concentrações de nitrito indicou valores não esperados. Os valores na concentração efluente eram maiores que no afluente (Tabela 2 do Anexo). Então, se postulou que estivesse ocorrendo nitrificação. No entanto, argônio (100%) era fluxionado nos quimiostatos e a concentração de oxigênio dissolvido analisada sempre foi zero.

Então, a partir do 85º dia, além de deixar borbulhando argônio o tempo todo, ao frasco de alimentação foi fixado um balão preenchido com Hélio para evitar a formação de vácuo dentro do frasco e manter o meio no frasco anóxico. Até então o frasco estava em contato com a atmosfera através de tampão de algodão para se evitar a contaminação pelo

ar.

A hipótese da nitrificação foi descartada, e as concentrações efluentes ainda se mantiveram maiores. Então a partir do 136º dia, as análises de nitrito e nitrato começaram a ser realizadas por análise de injeção em fluxo (FIA), e os valores encontrados foram menores que o do afluente.

Entre os dias 136 e 218 (etapa II), os quimiostatos se mantiveram estáveis (Figura 5.13) e com remoções de N-NO_2^- de $70,5 \pm 14,9\%$ e $70 \pm 15,7\%$ em Q1 e Q2 respectivamente, para concentrações afluentes médias de $70,6 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$. Durante este período as concentrações efluentes de nitrato em Q1 e Q2 estiveram sempre abaixo do limite de detecção, ou seja, abaixo de $0,5 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}$.

Entre os dias 219 e 232 (etapa III), os quimiostatos foram alimentados sem nitrito. O nitrito efluente analisado em Q1 e Q2 nos dias 220 e 224 foram devido ao residual de alimentações anteriores ainda presentes nos quimiostatos. O TDH em ambos quimiostatos calculado foi de 3,6 dias, considerando-se a vazão analisada em 18 mL/h e volume útil dos quimiostatos de $1,54 \text{ L}$.

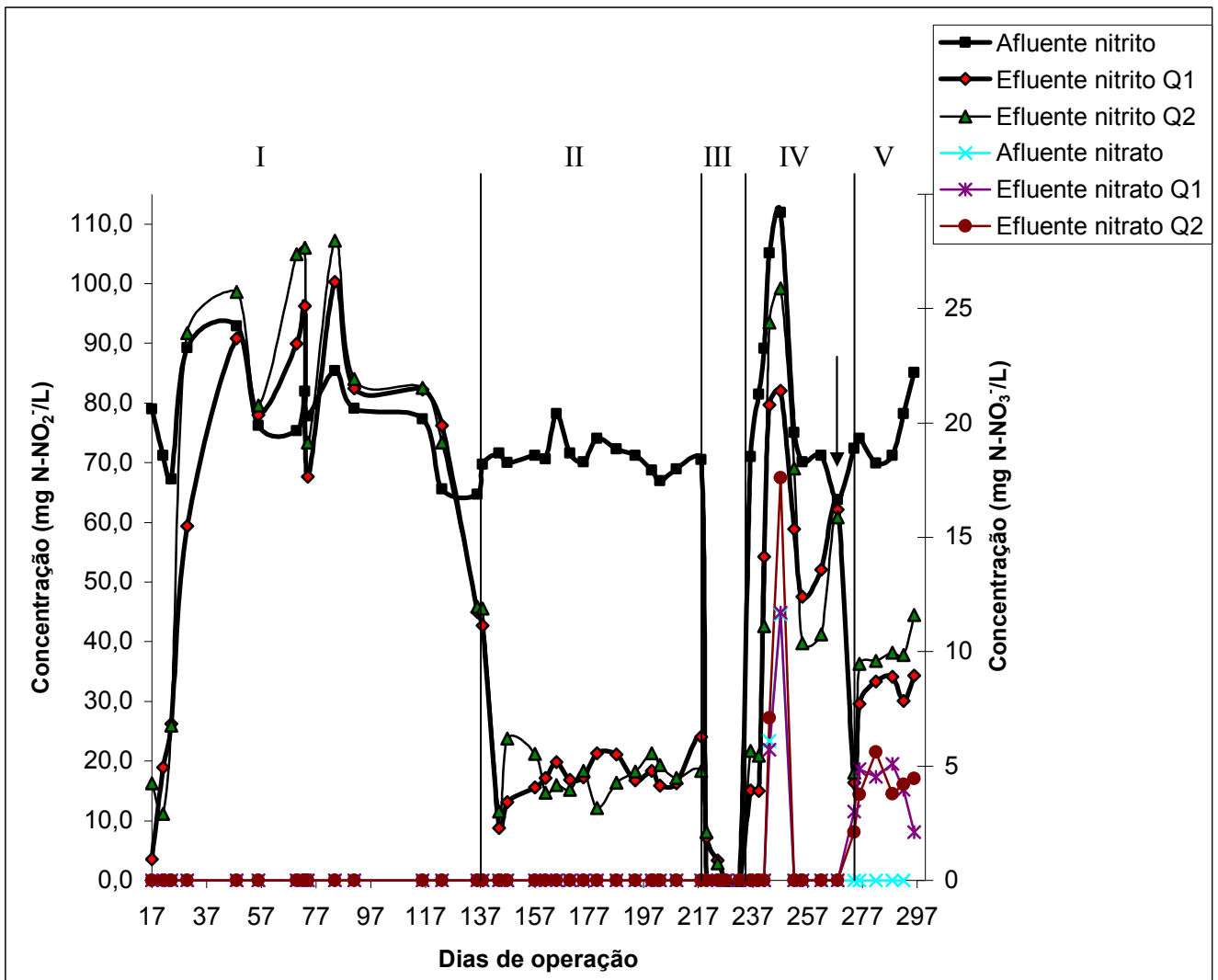
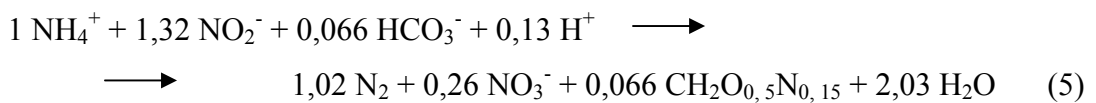


Figura 5.13. Variação temporal da concentração de nitrogênio na forma de nitrito e nitrato afluente e efluente em Q1 e Q2.

Após o período de nitrificação nas mangueiras e instabilidade (236-274 dias de operação), a estabilidade na remoção do nitrito voltou com 274 dias de operação (etapa V) com remoções médias de $60,5 \pm 9,2\%$ e $53,2 \pm 10,9\%$ para Q1 e Q2, respectivamente, com concentração afluente de $75,2 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}$.

Os valores de remoção do nitrito na etapa V (274-296° dia) foram ligeiramente menores que os encontrados na etapa II (136-218° dia). No entanto, na etapa V, também foi detectada presença de nitrato no afluente de Q1 e Q2, em acordo com o processo *anammox* (Eq. 5).



No dia 268 (seta) não foi detectada remoção, provavelmente por que no dia 263 foi

retirada biomassa dos quimiostatos para realização de ensaios em batelada, causando instabilidade (não verificada nas análises de amônia). Deve-se ainda ressaltar que a inibição pelo excesso de nitrito (111,9mg N-NO₂⁻/L no dia 247) foi reversível aos consórcios presentes nos dois quimiostatos.

Os valores da proporção N-NH₄⁺:N-NO₂⁻, a partir do 136º dia, estão expostos na Tabela 5.3 Os valores encontrados por JIANLONG & JING (2005) para estes parâmetros foram de 1:2,63, os quais sugerem que essa relação é devida a desnitrificação da matéria orgânica (dextrose) presente no meio de alimentação. Os valores encontrados, no período entre 136 e 296 dias de operação, estão relativamente próximos aos observados pelos autores *op. cit.* No entanto, as condições de alimentação de Q1 e Q2 favoreceram processos autotróficos, diferentemente das condições heterotróficas dos pesquisadores *op. cit.* O processo *anammox* ocorreu em Q1 e Q2, concomitantemente a desnitrificação da matéria orgânica endógena remanescente da morte celular.

Tabela 5.3. Quantidade removida de nitrogênio na forma dos compostos nitrogenados e proporção de remoção.

Operação (dias)	Remoção Q1		Proporção Q1	Remoção Q2		Proporção Q2
	mg N- NH ₄ ⁺ /L	mg N- NO ₂ ⁻ /L	N-NH ₄ ⁺ :N-NO ₂ ⁻	mg N- NH ₄ ⁺ /L	mg N- NO ₂ ⁻ /L	N-NH ₄ ⁺ :N-NO ₂ ⁻
136	24,96	19,73	1:0,79	22,84	18,78	1:0,82
138	15,65	27,00	1:1,72	13,96	24,10	1:1,73
144	18,61	62,83	1:3,38	17,77	60,12	1:3,38
147	18,19	56,93	1:3,13	18,19	46,32	1:2,55
157	13,1	55,6	1:4,24	16,5	50,0	1:3,03
161	12,0	53,4	1:4,45	13	55,9	1:4,30
165	22,2	58,4	1:2,63	16,3	62,2	1:3,82
170	18,8	54,7	1:2,91	19,9	56,4	1:2,83
175	22,2	52,8	1:2,38	23,6	51,8	1:2,19
180	18,1	52,8	1:2,92	23,2	62,0	1:2,67
187	22,2	51,2	2,31	24,6	55,9	1:2,27
194	23,2	54,4	1:2,34	22,5	53,0	1:2,35
200	25,8	50,4	1:1,95	25,2	47,4	1:1,88
203	18,7	51,1	1:2,73	20,8	47,7	1:2,29
209	16,5	52,6	1:3,19	16,4	51,7	1:3,15
218	21,5	46,4	1:2,16	22	52,2	1:2,37
220	4,3	-7,2	n.a.	4,5	-8,1	n.a.
224	3,7	-3,4	n.a.	5,8	-2,9	n.a.
227	11,7	0	n.a.	10,5	0,0	n.a.
232	7,2	0	n.a.	8,1	0,0	n.a.
236	7,2	55,9	1:7,76	23	49,3	1:2,14
239	2,2	66,5	1:30,23	21,8	60,6	1:2,78
241	7,4	34,95	1:4,72	26,9	46,6	1:1,73
243	4,2	25,36	1:6,04	24,3	11,6	1:0,48
247	-21,0	29,82	n.a.	3,1	12,7	1:4,10
252	22,7	16,17	1:0,71	24,7	5,9	1:0,24
255	43,0	22,59	1:0,53	53,4	30,4	1:0,57
262	37,8	19,1	1:0,51	28,3	30,0	1:1,06
268	23,3	1,76	1:0,08	33,1	3,0	1:0,09
274	26,6	56,01	1:2,10	16,26	54,3	1:3,34
276	42,3	44,54	1:1,05	25,09	37,8	1:1,51
282	42,2	36,52	1:0,87	23,58	33,1	1:1,41
288	51,3	37,1	1:0,72	34,3	33,0	1:0,96
292	48,4	48,1	1:0,99	32,2	40,4	1:1,26
296	48,3	50,75	1:1,05	29,62	40,6	1:1,37

n.a. não aplicável devido à ausência de nitrito afluente

A proporção entre a amônia e nitrito removido e nitrato gerado está exposto na Tabela 5.4 mostrando relativa similaridade com a equação estequiométrica da *anammox*, principalmente após o dia 276. A Tabela 5.5 mostra os parâmetros estequiométricos

encontrados em alguns reatores *anammox*, mostrando que os valores encontrados neste trabalho estão em acordo com a literatura.

Tabela 5.4. Parâmetros estequiométricos de amônia e nitrito removidos e nitrato gerado, a partir do 274º dia de operação.

Operação (dias)	Q1	Q2
	N-NH ₄ ⁺ :N-NO ₂ ⁻ :N-NO ₃ ⁻	N-NH ₄ ⁺ :N-NO ₂ ⁻ :N-NO ₃ ⁻
274	1:2,10:0,11	1:3,34: 0,13
276	1:1,05:0,12	1:1,51: 0,15
282	1:0,87:0,11	1:1,41: 0,24
288	1:0,72:0,10	1:0,96: 0,11
292	1:0,99:0,08	1:1,26: 0,13
296	1:1,05:0,04	1:1,37: 0,15

Tabela 5.5. Comparação entre parâmetros estequiométricos encontrados na literatura e desta pesquisa.

Referência	N-NH ₄ ⁺ :N-NO ₂ ⁻ :N-NO ₃ ⁻
STROUS <i>et al.</i> (1998)	1:1,3:0,26
DAPENA-MORA <i>et al.</i> (2004) Reator gas-lift	1:1,28:0,26
TOH <i>et al.</i> (2002)	1:1:0
DAPENA-MORA <i>et al.</i> (2004) Reator em batelada	1:1,11:0,2
Quimioestado Q1	1:1,13:0,1
Quimioestado Q2	1:1,64:0,1

REGINATTO *et al.* (2005,) operando reator seqüencial em batelada alimentado com concentrações afluentes próximas às desta pesquisa, obtiveram no final da operação, eficiência de remoção de nitrogênio total em torno de 40% com carga nitrogenada total aplicada de 40mg N/L_{reator}.dia. Na etapa V Q1 obteve eficiência de remoção de nitrogênio total de 57,1±4,1% para carga nitrogenada total aplicada de 43,5±1,0 mg N (N-NO₂⁻ + N-NH₄⁺)/L_{reator}.dia, enquanto Q2 obteve eficiência de 43,0±3,4% para mesma carga aplicada (Tabelas 5.6 e 5.7).

TOH *et al.* (2002), avaliaram reator de leito fixo, com carga nitrogenada total aplicada próxima de 200mg N/L_{reator}.dia e obtiveram carga nitrogenada total removida de 118mg N/L_{reator}.dia, após 243 dias de operação. A eficiência de remoção foi de aproximadamente 58%; ou seja, próxima à eficiência de Q1 (57,1%) (Tabela 5.6). No entanto, a carga nitrogenada total removida pelos pesquisadores *op. cit.* foi maior devida a maior carga nitrogenada total aplicada.

Em Q1 a carga nitrogenada (amônia) removida foi maior na etapa V ($12,1 \pm 2,5 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$) em relação a etapa II ($5,5 \pm 1,1 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$), como mostra a Tabela 5.6. Em Q2 também foi observado aumento na carga nitrogenada (amônia) removida na etapa V ($7,5 \pm 1,9 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$) em relação à etapa II ($5,6 \pm 1,1 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$) como mostra a Tabela 5.7.

A carga nitrogenada (nitrito) removida em Q1 diminuiu na etapa V ($10,5 \pm 5,3 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$) em relação à etapa II ($14 \pm 3,1 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$). No quimiostato Q2 também foi observado este comportamento com diminuição da remoção de carga nitrogenada (nitrito) na etapa V ($9,4 \pm 4,7 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$) em relação à etapa II ($13,9 \pm 3,4 \text{ mg N-NO}_2^-/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$), como mostram as Tabelas 5.6 e 5.7.

Apesar desta queda na remoção de nitrito em ambos quimiostatos, Q1 teve eficiência de remoção de nitrogênio total aumentada de 50,9% na etapa II para 57,1% na etapa V. O quimiostato Q2 teve eficiência de remoção de nitrogênio total diminuída de 50,8% na etapa II para 43% na etapa V.

Em Q1, a carga nitrogenada total removida na etapa V foi maior que no primeiro período de estabilização (etapa II), atingindo valores de $24,9 \pm 2,2 \text{ mg N}/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$. No entanto, Q2 obteve maior carga nitrogenada total removida na etapa II, com valor de $19,5 \pm 3,6 \text{ mg N}/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$ (Tabelas 5.6 e 5.7).

Os valores encontrados nesse trabalho não são comparáveis à maioria dos resultados de reatores *anammox* publicados na literatura, pois a maioria dos reatores *anammox* são operados com carga nitrogenada total aplicada de até $2,63 \text{ g N}/\text{L}_{\text{reator}} \cdot \text{dia}$ (Jetten *et. al.*, 1999) e com eficiências de remoção de até 95% de nitrogênio total. No entanto, alguns destes reatores contêm biomassa adaptada às condições *anammox* por mais de três anos.

Talvez a configuração dos quimiostatos (com meio fresco gotejando na superfície e tubo coletor do efluente também na superfície) tenha limitado o contato do meio novo com a biomassa. Todavia, tal procedimento tem se mostrado eficiente no enriquecimento de consórcio microbiano apto às condições de oxidação anaeróbia da amônia; ou seja, meio com bicarbonato, amônia e nitrito em concentrações equimolares, calculadas em 5mM de cada composto, pH igual a 8 e temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabela 5.6. Carga volumétrica de cada composto nitrogenado e total e respectivas remoções médias (\pm desvio padrão), nos dois períodos de estabilização de Q1.

Período	Carga nitrogenada (amônia) aplicada Q1	Carga nitrogenada (amônia) removida Q1	Carga nitrogenada (nitrito) aplicada Q1	Carga nitrogenada (nitrito) removida Q1	Carga nitrogenada total aplicada Q1	Carga nitrogenada total removida Q1	Remoção de nitrogênio total Q1
(dias)	$(\text{mg N-NH}_4^+ / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N-NH}_4^+ / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N-NO}_2^- / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N-NO}_2^- / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N(N-NO}_2^- + \text{N-NH}_4^+) / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N(N-NO}_2^- + \text{N-NH}_4^+) / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	(%)
Etapa II 136-218° dia	18,5 \pm 0,9	5,5 \pm 1,1	19,8 \pm 0,8	14 \pm 3,1	38,3 \pm 1,2	19,5 \pm 3,1	50,9 \pm 7,8
Etapa V 274-296° dia	22,4 \pm 0,8	12,1 \pm 2,5	20,1 \pm 1,3	10,5 \pm 5,3	43,5 \pm 1,0	24,9 \pm 2,2	57,1 \pm 4,1

Tabela 5.7. Carga volumétrica de cada composto nitrogenado e total e respectivas remoções médias (\pm desvio padrão), nos dois períodos de estabilização de Q2.

Período	Carga nitrogenada (amônia) aplicada Q2	Carga nitrogenada (amônia) removida Q2	Carga nitrogenada (nitrito) aplicada Q2	Carga nitrogenada (nitrito) removida Q2	Carga nitrogenada total aplicada Q2	Carga nitrogenada total removida Q2	Remoção de nitrogênio total Q2
(dias)	$(\text{mg N-NH}_4^+ / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N-NH}_4^+ / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N-NO}_2^- / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N-NO}_2^- / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N(N-NO}_2^- + \text{N-NH}_4^+) / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	$(\text{mg N(N-NO}_2^- + \text{N-NH}_4^+) / L_{\text{reator}} * \text{dia})$	(%)
Etapa II 136-218° dia	18,5 \pm 0,9	5,6 \pm 1,1	19,8 \pm 0,8	13,9 \pm 3,4	38,3 \pm 1,2	19,5 \pm 3,6	50,8 \pm 8,9
Etapa V 274-296° dia	22,4 \pm 0,8	7,5 \pm 1,9	20,1 \pm 1,3	9,4 \pm 4,7	43,5 \pm 1,0	18,7 \pm 1,7	43,0 \pm 3,4

5.3. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* COM SONDAS FLUORESCENTES (FISH)

A técnica do FISH confirmou a presença de organismos *anammox* nos consórcios enriquecidos nos dois quimiostatos. As Figuras 5.14 a 5.16 mostram fotomicrografias, do mesmo campo de visualização, em contraste de fase, epifluorescência com filtro WU (DAPI) e WG (sonda Cy3), da biomassa presente em Q1. A Figura 5.18 a 5.20 mostra fotomicrografias do consórcio enriquecido no quimiostato Q2, revelando resultados similares aos observados em Q1.

Nas Figuras 5.17 e 5.19, observa-se que as células coradas apresentaram-se aglomeradas, indicando que, possivelmente, sejam os mesmos aglomerados observados por microscopia de contraste de fase (Figuras 5.15. e 5.18.).

SCHMID *et. al.* (2003) utilizaram mesma sonda para caracterização de culturas *anammox*, e observaram morfologias semelhantes (aglomerados de cocos) coradas com a sonda. Desta forma, estes aglomerados de cocos corados com sonda Cy3 específica (Figuras 5.16 e 5.19) são células *anammox* com morfologia semelhante a observada por SCHMID *et. al.* (2003) e EGLI *et. al.* (2003).

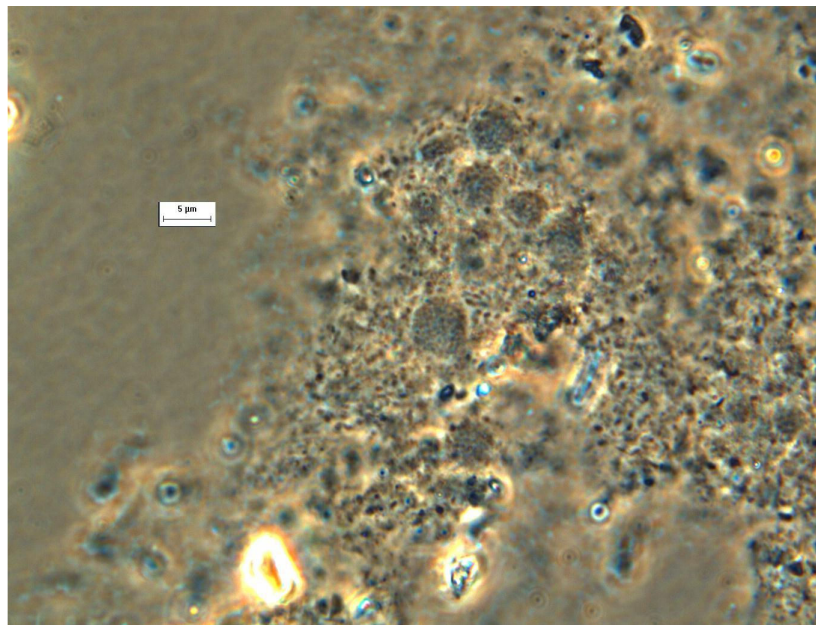


Figura 5.14. Microscopia de contraste de fase do consórcio enriquecido em Q1 após 312 dias de operação.

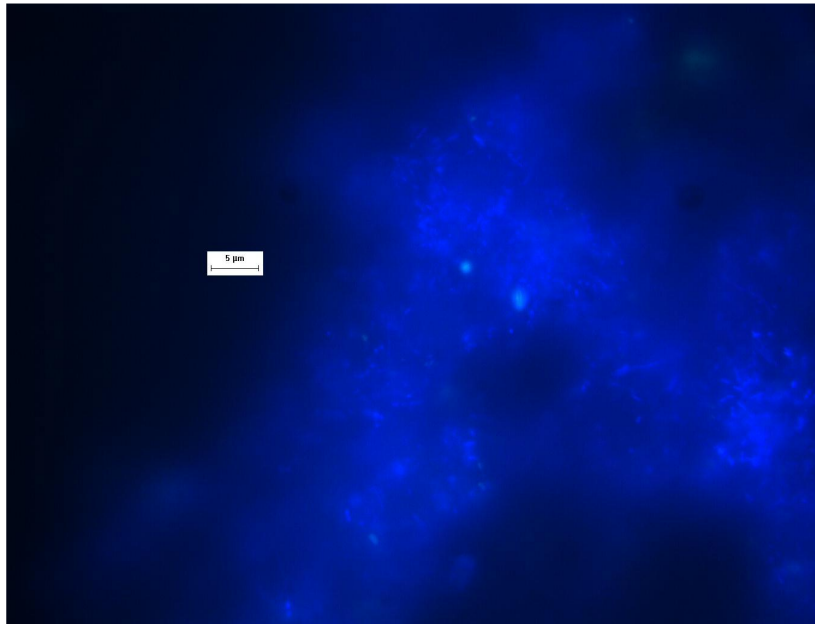


Figura 5.15. Microscopia de epifluorescência do consórcio enriquecido em Q1 após 312 dias de operação coradas com DAPI.

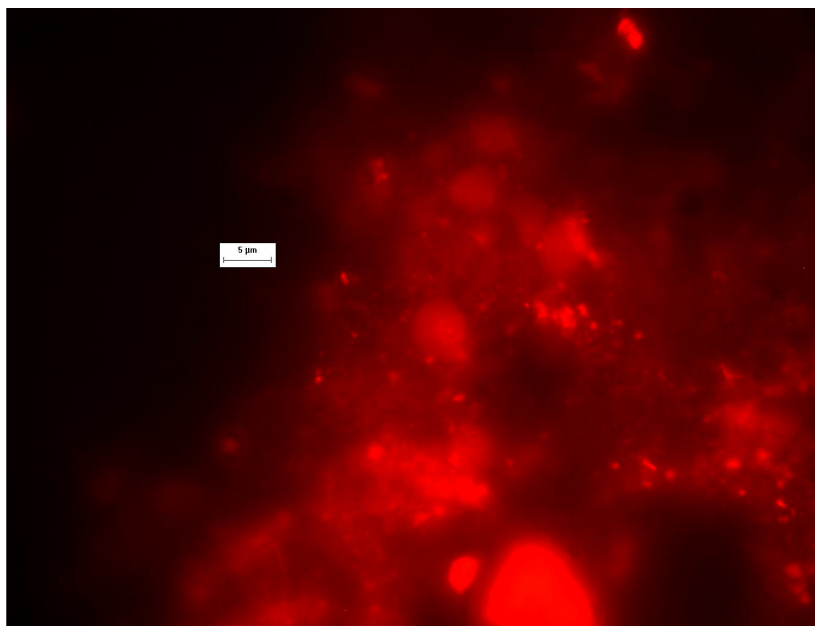


Figura 5.16. Microscopia de epifluorescência do consórcio enriquecido em Q1 após 312 dias de operação hibridadas com sonda AMX-368 CY3.

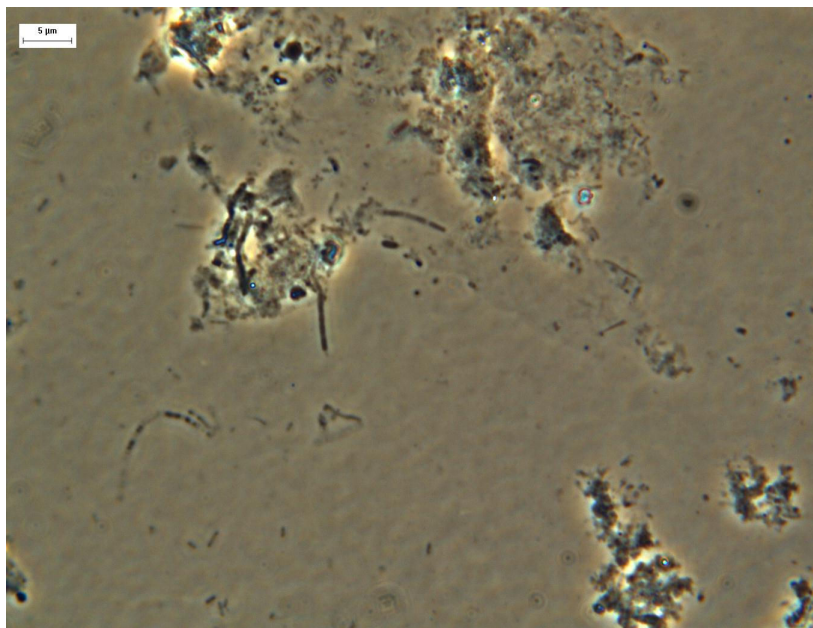


Figura 5.17. Microscopia de contraste de fase do consórcio enriquecido em Q2 após 312 dias de operação.

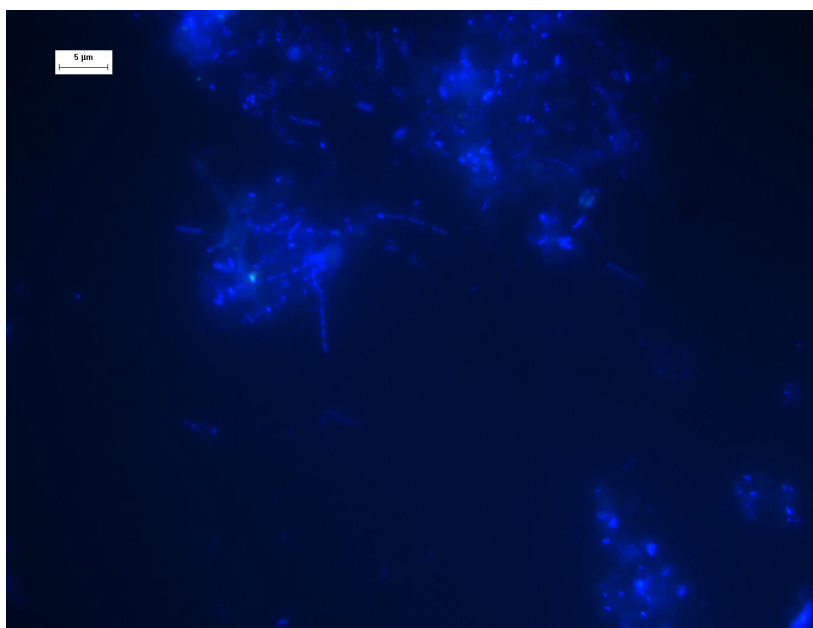


Figura 5.18. Microscopia de epifluorescência do consórcio enriquecido em Q2 após 312 dias de operação coradas com DAPI.

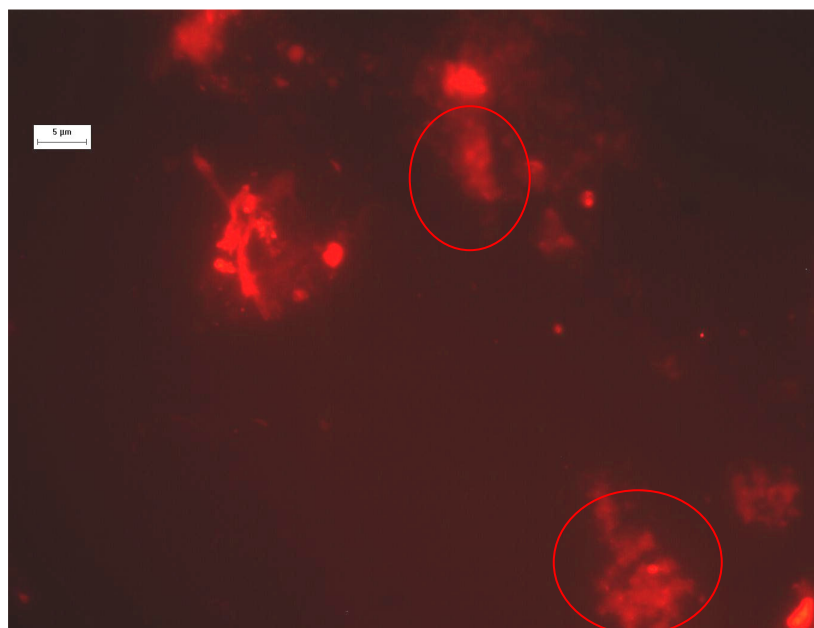


Figura 5.19. Microscopia de epifluorescência do consórcio enriquecido em Q2 após 312 dias de operação hibridadas com sonda AMX-368 CY3.

5.4. ANÁLISE DA COMUNIDADE MICROBIANA

A avaliação da estrutura da comunidade microbiana, presente em Q1 e Q2, em relação ao tempo de operação foi realizada por técnica de PCR/DGGE. Nesta análise cada banda foi considerada como pertencente a uma população microbiana.

A Figura 5.20 mostra o gel de DGGE do consórcio microbiano presente em Q1 em cada canaleta foi inserida alíquota de produto de PCR (*primers* 968FGC e1392R) em diferentes dias de operação.

As bandas 1 e 2 que aparecem no inóculo desapareceram após 143 dias de operação, indicando que, provavelmente, pertenciam a populações heterotróficas que necessitavam de matéria orgânica carbonácea em elevada concentração.

A banda 3 se manteve em Q1 somente até 197 dias de operação, e não foi observada com 143 dias de operação devido a falha no processo de extração de DNA, como pode ser observado na canaleta 2, a coloração com Brometo de etídeo foi pouco evidente.

As bandas 4 e 5 não observadas no inóculo são, provavelmente ligadas a populações relacionadas ao ciclo de nitrogênio favorecidas pelas condições de operação de Q1, assim como a banda 7 que se tornou muito evidenciada com 316 dias de operação.

A banda 6 foi primeiramente observada após a purificação com protocolo Percoll com 262 dias de operação, se manteve até 316 dias de operação, indicando estabelecimento no consórcio. Neste período de operação, provavelmente, a população *anammox* estava bem

estabelecida conforme dados de operação do quimiostato Q1.

A banda 7 foi visualizada a partir de 197 dias, mas tornou-se muito evidente com 316 dias de operação de Q1, indicando estabelecimento desta população no consórcio microbiano.

As bandas que estão evidenciadas no inóculo, e em todos os períodos analisados, são pertencentes a populações de microrganismos aptos às condições presentes em nichos do reator UASB de abatedouro de aves, e as condições presentes em Q1.

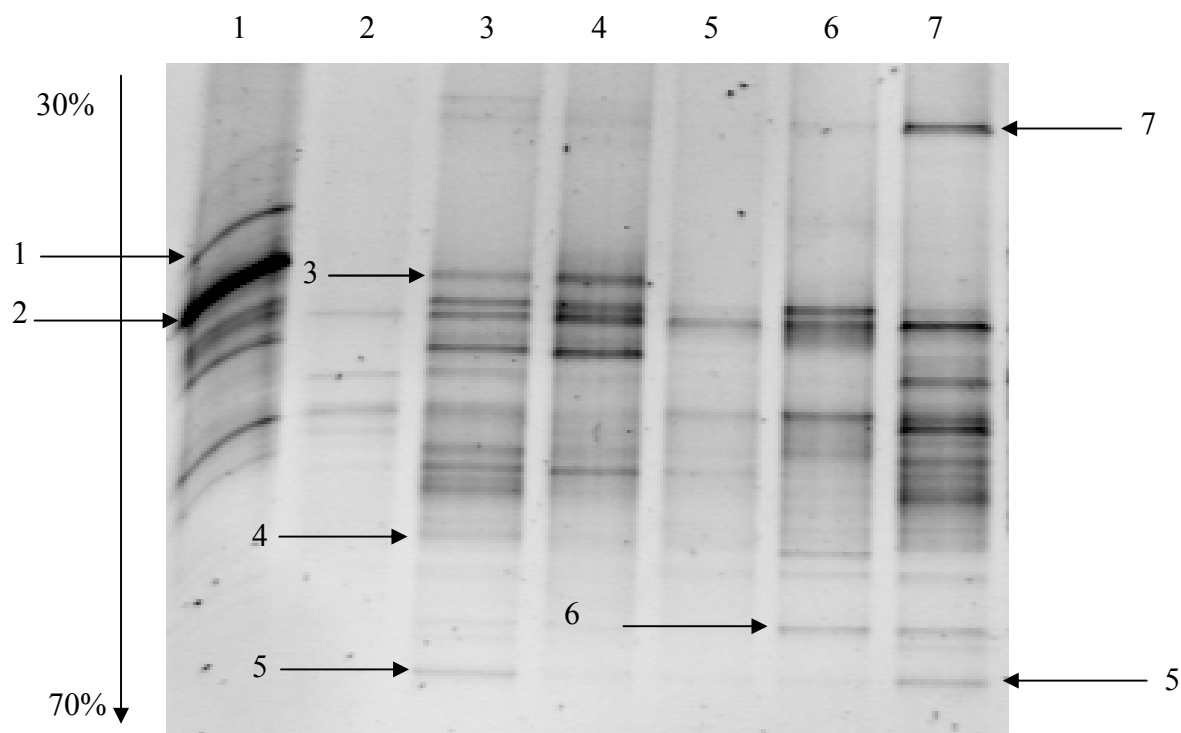


Figura 5.20. Fotografia da análise de DGGE de produtos de PCR com *primers* universais para Domínio *Bacteria* (968F-1392R) das amostras do Quimiostato Q1. Canaleta 1 = inóculo, 2 = 143 dias, 3 = 197 dias, 4 = 197 dias após purificação (Percoll), 5 = 262 dias, 6 = 262 dias após purificação (Percoll), 7 316 dias.

A Figura 5.21 mostra o gel de DGGE do consórcio microbiano presente em Q2. Em cada canaleta foi inserida alíquota de produto de PCR (*primers* 968FGC e1392R) dos diferentes dias de operação.

O agrupamento de bandas 1 desapareceu com 143 dias de operação, indicando que essas bandas pertenciam a microrganismos selecionados negativamente, ou seja, excluídos do consórcio presente em Q2.

A banda 2 foi observada somente com 197 dias de operação (amostra sem purificar e purificada), indicando que esta população com baixa concentração de G+C pode ter sido prejudicada pela elevada concentração de nitrito afluente entre os dias 236 e 247, sendo pouco evidente com 316 dias de operação. A banda 5 revelou população com

comportamento similar ao da população presente na banda 2, no entanto esta população estava evidenciada no inóculo.

A banda 3 revelou população favorecida nas condições ambientais do quimiostato 2, permanecendo até o final de operação, provavelmente estavam presentes no inóculo em baixa população e foram selecionadas. As populações presentes nas bandas 4 e 5 foram retiradas pelo processo de purificação conforme visualização nas canaletas 4 e 5.

A banda 6 aparece muito evidenciada com 316 dias de operação estava presente desde o inóculo. Porém, pouco evidenciada com 197 dias de operação, esta banda está relacionada com microrganismos pertencentes ao grupo das bactérias verdes não-sulfurosas, como será discutido adiante.

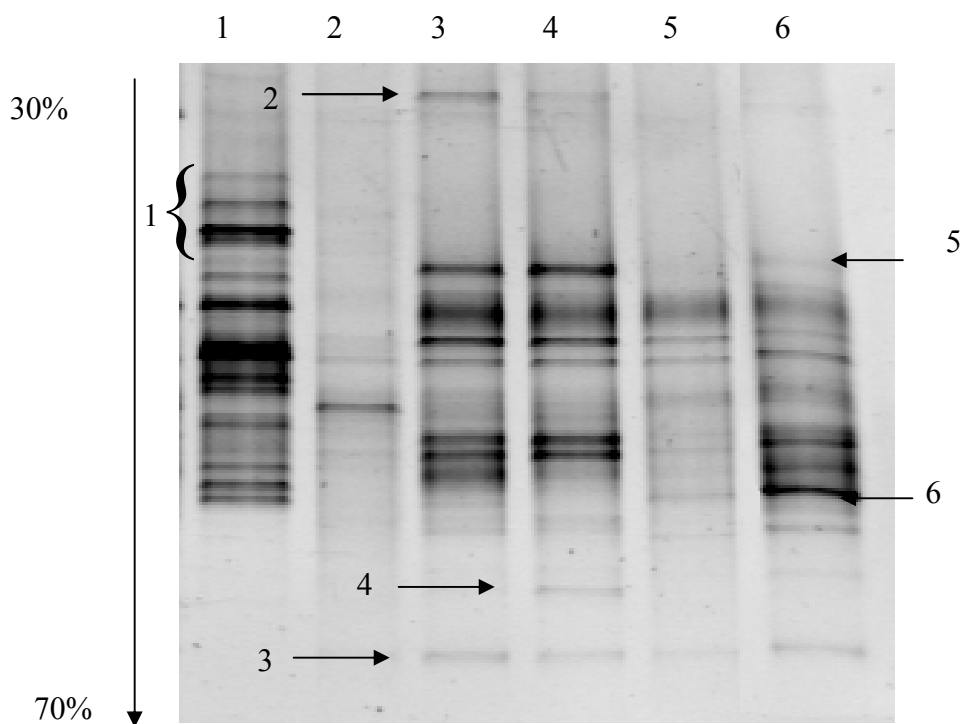


Figura 5.21. Fotografia da análise de DGGE de produtos de PCR com *primers* universais para Domínio *Bacteria* (968F-1392R) das amostras do Quimiostato Q2. Canaleta 1 = inóculo, 2 = 143 dias, 3 = 197 dias, 4 = 197 dias após purificação (Percoll), 5 = 262 dias, 6 = 316 dias.

5.5. SEQÜENCIAMENTO DE BANDA E FILOGENIA

Foram recortadas nove bandas do gel de DGGE, eluídas em água para recuperação do DNA, reamplificadas utilizando-se os *primers* 968F-1392R sem GC *clamp* e sequenciadas. As bandas recortadas estão nas Figuras 5.22 e 5.23. As seqüências obtidas

foram verificadas e comparadas com banco de dados *GenBank*. As amostras com maior similaridade foram alinhadas e utilizadas para construção de árvore filogenética. A região do DNA ribossomal 16S amplificada situa-se entre as bases 968 e 1392 homólogas a posição em *E. coli* (Brosius *et al.* 1978).

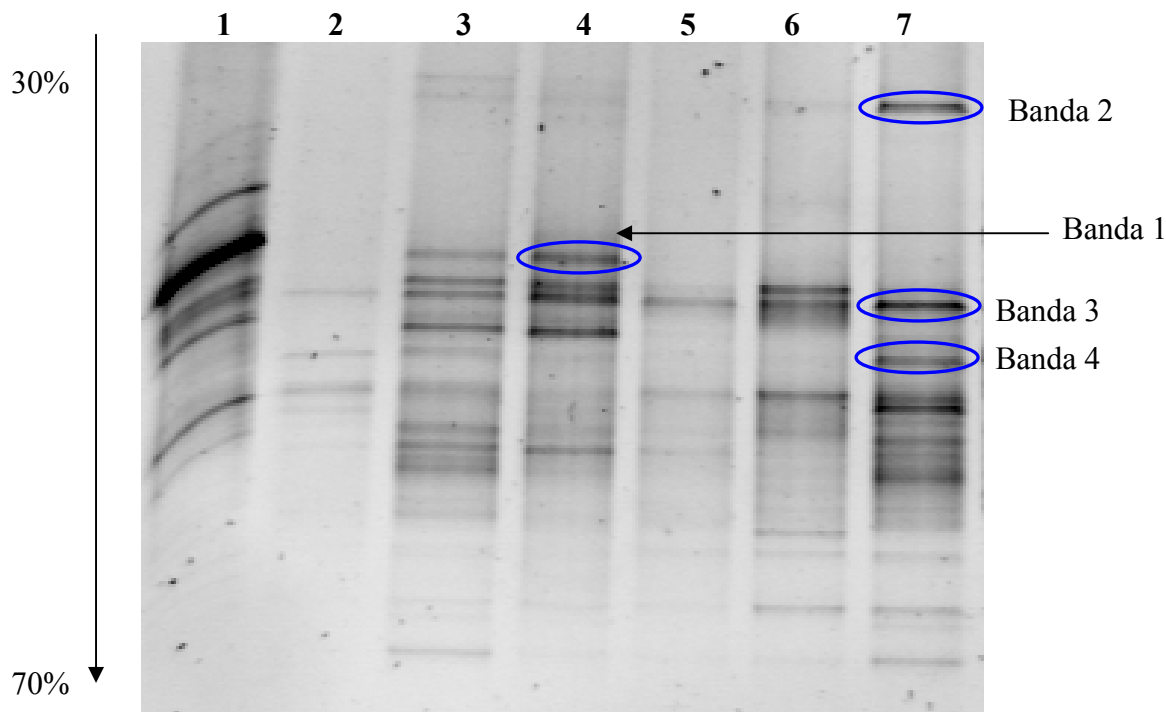


Figura 5.22. Fotografia da análise de DGGE de produtos de PCR com *primers* universais para Domínio *Bacteria* (968F-1392R) das amostras do Quimiostato Q1, com bandas retiradas para seqüenciamento. Canaleta 1 = inóculo, 2 = 143 dias, 3 = 197 dias, 4 = 197 dias após purificação (Percoll), 5 = 262 dias, 6 = 262 dias após purificação (Percoll), 7 316 dias.

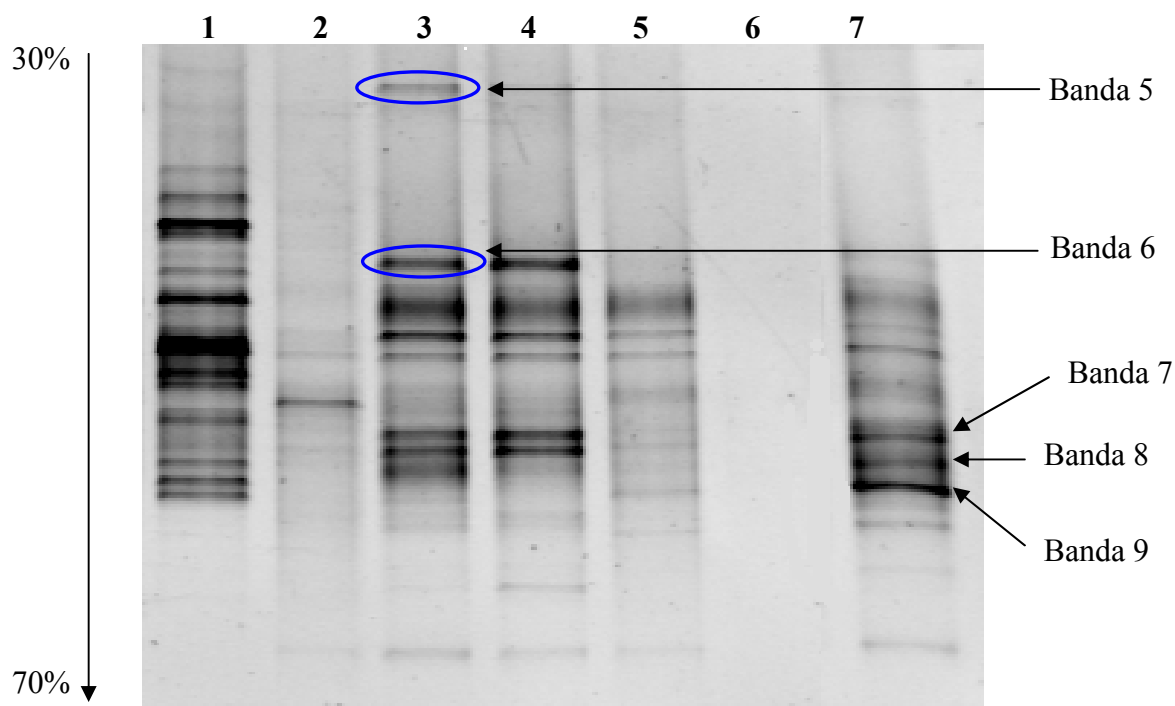


Figura 5.23. Fotografia da análise de DGGE de produtos de PCR com *primers* universais para Domínio *Bacteria* (968F-1392R) das amostras do Quimiostato Q2, com bandas retiradas para seqüenciamento. Canaleta 1 = inóculo, 2 = 143 dias, 3 = 197 dias, 4 = 197 dias após purificação (Percoll), 5 = 262 dias, 6 = 262 dias após purificação (Percoll), 7 316 dias.

A análise filogenética, ainda, é a maneira mais eficiente de se estabelecer as relações entre diferentes organismos e não depende de similaridade, porém a busca por seqüências similares é o ponto de partida para análises filogenéticas.

O BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) encontra regiões com similaridade entre duas seqüências. O programa compara seqüências de nucleotídeos com banco de dados e calcula o significado estatístico da comparação (e-value).

Na comparação com seqüências podem ocorrer “buracos” (*gaps*) entre dois pares de bases para ocorrer pareamento, por exemplo: a seqüência 1 (recorte da Banda 1) apresentou similaridade de 97% com *Criblamydia sequanensis*. No entanto, quando as seqüências foram observadas em árvore filogenética, as seqüências 1 a 6 e 8 não se relacionaram filogeneticamente com as clamídias e ficaram distantes dos demais grupos (árvore não apresentada). Deve-se ressaltar que as seqüências oriundas das amostras 1, 5 e 6 apresentaram similaridades elevadas com bactérias do grupo das clamídias.

As bactérias pertencentes ao grupo das clamídias são todas endoparasitas obrigatórias, sofrendo pressões seletivas diferentes de organismos de vida livre como os pertencentes em reatores biológicos. Além disso, apresentam evolução diferente, com tendência a perder pares de bases (pb), mesmo em regiões conservadas como DNA

ribossomal 16S. Portanto, não foram utilizadas na construção da árvore (BAPTESTE and GRIBALDO, 2003).

Além disso, a similaridade elevada não necessariamente significa proximidade filogenética. As seqüências podem ser parecidas no entanto, pertencentes à regiões diferentes do DNAr 16S, portanto não homólogas e sem proximidade filogenética.

Depois de pronta árvore com esse padrão anormal, o alinhamento foi averiguado com maior rigor, e observou-se que essas amostras (1-6 e 8) não tinham alguns motivos (pequenas seqüências conservadas e, presentes em todos microrganismos do *Domínio* Bacteria), também verificou-se presença elevada de *gaps*.

Portanto, para construção da árvore filogenética descartou-se as seqüências 1 a 6 e 8. A primeira árvore, efetivamente construída, utilizou as seqüências 7 e 9 (oriundas de Q2 com 316 dias de operação). As maiores similaridades obtidas do GenBank pelo BLAST relacionadas ao grupo das Bactérias verdes não-sulfurosas e alguns representantes de outros filos, tais como *Planctomyces*, *Firmicutes*, *Bacterioidetes*, Actinobactérias e *Proteobacteria* estão apresentadas na Figura 5.24. As seqüências 7 e 9 foram relacionadas filogeneticamente com amostras ambientais de bactérias verdes não-sulfurosas.

A seqüência 9 apresentou similaridade de 97% com clones não cultiváveis SBR1029 e SBR1064 de reator sequencial em batelada usado na remoção de fósforo (Bond *et al.*, 1995). A seqüência 7 apresentou 87% de similaridade com bactérias não cultiváveis ChloroflexiA11b, A30, H1 e H19, de lodo de reator nitrificante-desnitrificante (Juretschko *et al.*, 2002), enquanto essas mesmas seqüências apresentaram similaridade de 97% com a amostra 9.

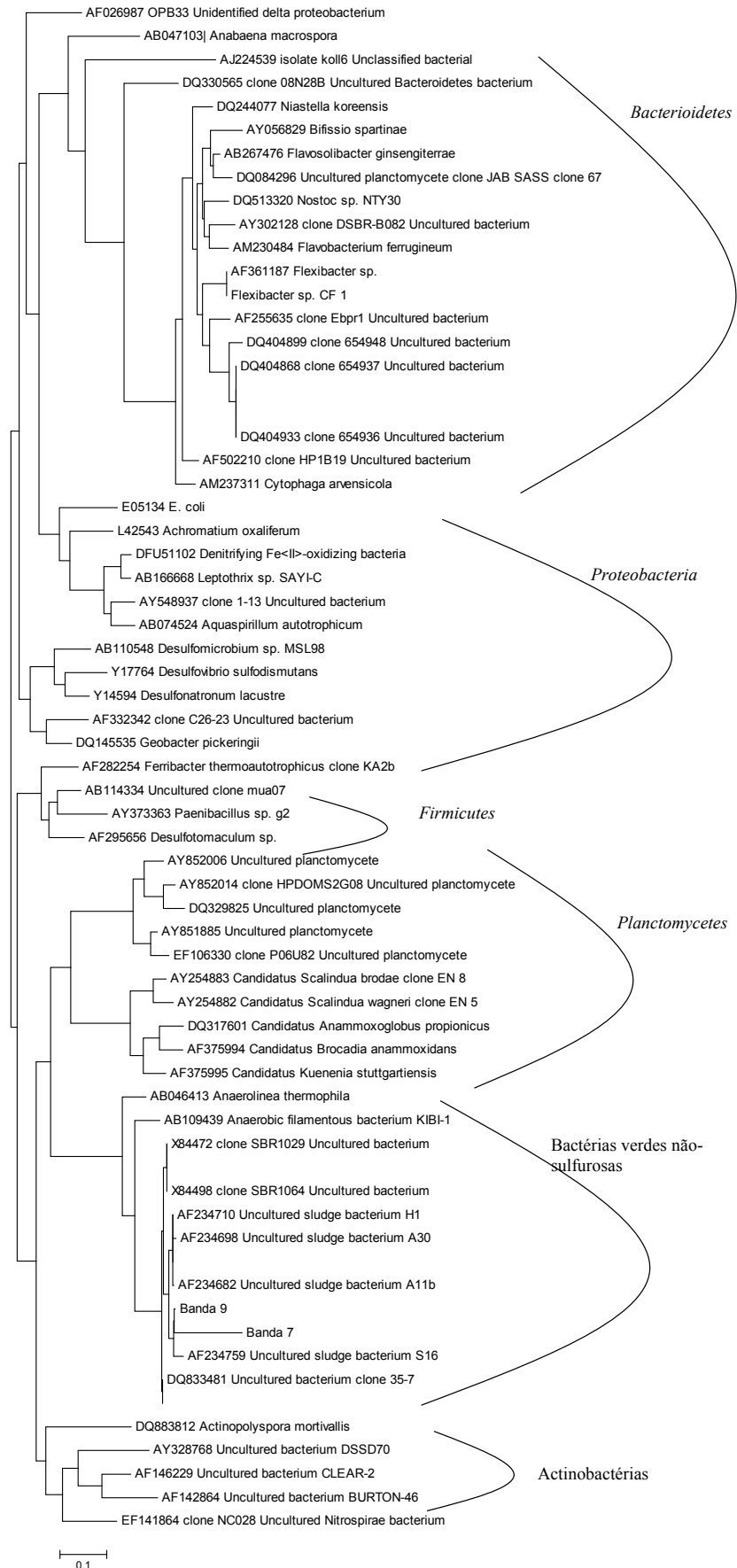


Figura 5.24. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do DNA ribossomal 16S, mostrando similaridades entre seqüências obtidas das bandas 7 e 9 e membros do grupo das Bactérias verdes não sulfurosas, filo *Planctomyces*, *Bacterioidetes*, Actinobactérias, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. A barra significa distância filogenética relativa, observada somente horizontalmente, entre dois ramos da árvore.

A Figura 5.25 mostra árvore filogenética contendo as seqüências 7 e 9, bactérias verdes não-sulfurosas (Chloroflexi) mais relacionadas, bactérias *anamnox*, *E. coli* e *Aquifex aeolicus* como grupo externo. Observa-se que as seqüências 7 e 9 agruparam principalmente com os clones S16, A11b, H11, H19 e A30. Esses clones são de seqüências obtidas de reator nitrificante-desnitrificante usado no tratamento de água residuária industrial (Juretschko *et al.*, 2002). No trabalho dos autores *op.cit.* também é relatada a distância filogenética destes clones com bactérias cultiváveis.

A Figura 5.26 mostra como as seqüências do presente trabalho e as seqüências obtidas por JURETSCHKO *et al.*, 2002 são distantes filogeneticamente das bactérias verdes não sulfurosas cultiváveis.

Os representantes de *Proteobacteria* (incluindo bactérias púrpuras fotossintéticas), Cytophagales (grupo dos Bacteroides/Cytophaga/Flexibacter) e as duas divisões de organismos Gram-positivos (*Actinobacteria* e Gram-positivos de baixo conteúdo de G+C), de distribuição cosmopolita são exemplos de organismos bem conhecidos através de representantes cultivados. Em contraste, organismos das Divisões *Acidobacterium*, bactérias verdes não-sulfurosas (Chloroflexi) e *Verrucomicrobium*, que também apresentam distribuição cosmopolita, evidenciada por estudos de seqüências de DNAr 16S clonadas do meio ambiente, são pouco representados por organismos cultivados e, conseqüentemente, pouco se sabe sobre a sua biologia e propriedades metabólicas (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Bactérias Verdes Não-Sulfurosas formam grupo constituído por organismos com morfologia filamentosa ou cocóide (*Sphaerobacter thermophilus*), incluindo representantes cultivados com metabolismo fototrófico anóxico (*Chloroflexus* sp.) e organotrófico termófilo (*Herpetosiphon aurantiacus*, *Sphaerobacter thermophilus* e *Thermomicrobium roseum*). Espécies de *Chloroflexus* são metabolicamente versáteis, pois podem se desenvolver no escuro, como organismos quimiorganotróficos e sob condições aeróbias por fotoautotrofia ($H_2S + CO_2$ ou $H_2 + CO_2$) (Madigan *et al.*, 2004). Em geral usam compostos orgânicos reduzidos como doadores de elétrons para fixação de CO_2 .

A diversidade metabólica destes organismos e a ocorrência de organismos não-cultivados em diversos habitats, incluindo aquíferos, fontes geotermiais, ambientes marinhos, sedimentos e solo, e águas residuárias, sugerem que estes organismos possam ter um papel ecológico importante nestes ambientes. *Oscillochloris trichoides* e *Chloronema giganteum* podem se desenvolver em lagos de água doce com baixos teores de sulfeto em conjunto com bactérias verdes e púrpuras sulfurosas (Madigan *et al.*, 2004).

Bactérias verdes não-sulfurosas (Chloroflexi)

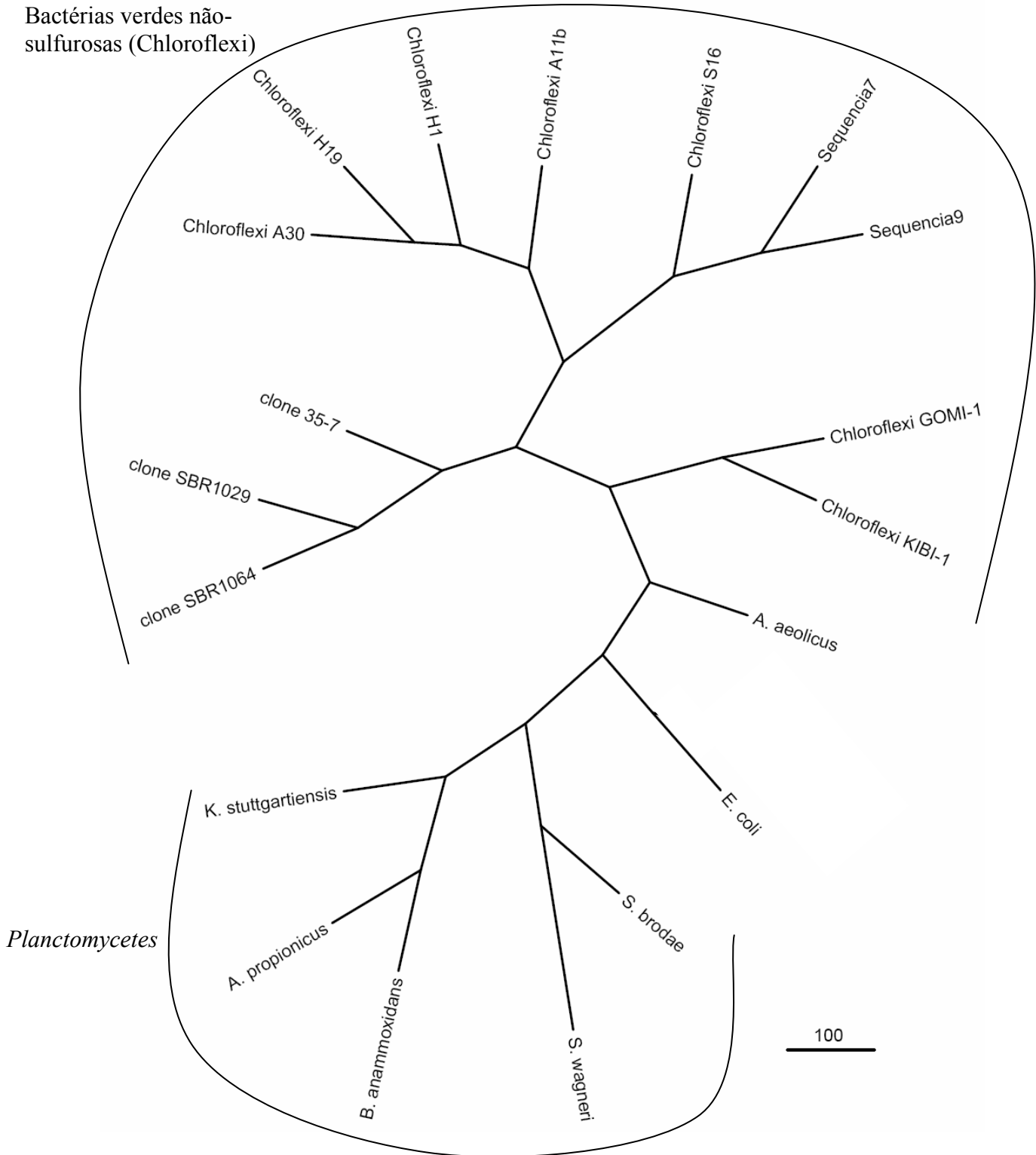


Figura 5.25. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do DNA ribossomal 16S das seqüências 7 e 9 em relação ao grupo de bactérias verdes não-sulfurosas (filo Chloroflexi) mais relacionadas, bactérias *anammox*, *E. coli*. *Aquifex aeolicus* foi utilizado como grupo externo. A barra significa distância filogenética relativa entre dois ramos da árvore.

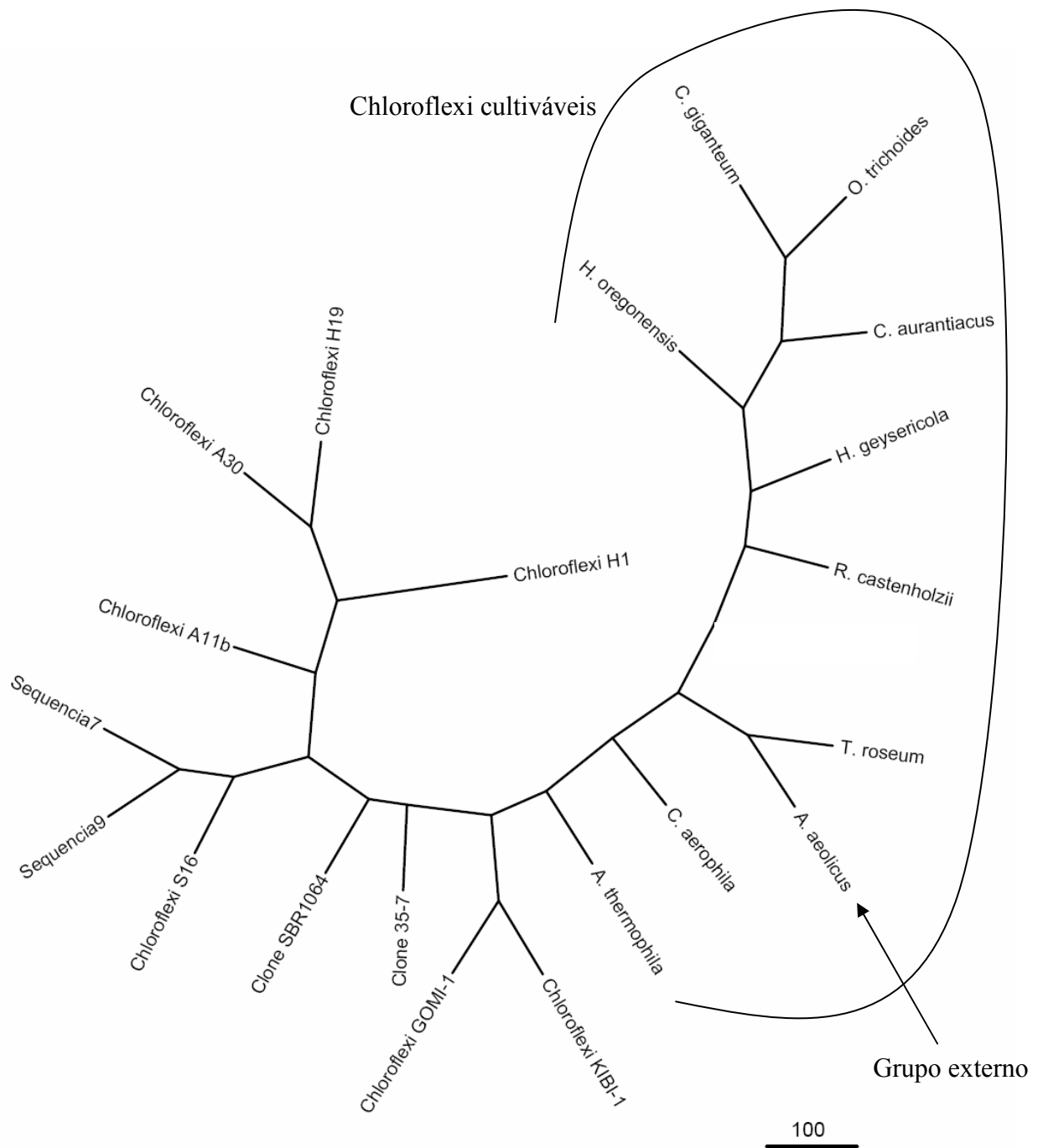


Figura 5.26. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do DNA ribossomal 16S das seqüências 7 e 9 em relação ao grupo de bactérias verdes não-sulfurosas (Chloroflexi). *Aquifex aedlicus* foi utilizado como grupo externo. A barra significa distância filogenética relativa entre dois ramos da árvore. *Thermomicrobium roseum* é bactéria verde não-sulfurosa de ramificação precoce, por isso agrupou nesta árvore com *Aquifex aedlicus* (grupo externo).

Provavelmente os filamentos encontrados em microscopia de contraste de fase (Figura 5.7) estão relacionados com grupo de bactérias verdes não sulfurosas. A presença deste grupo no quimiostato (Q2) não é surpreendente, pois as espécies mais relacionadas pela árvore filogenética são *Anaerolinea thermophila* e *Caldilinea aerophila* descritas por

SEQUIGUCHI *et al.* (2003). Essas duas espécies crescem sob condições fermentativa e fermentativa ou aeróbia, respectivamente. As duas espécies não crescem sob nenhuma condição fototrófica e o substrato preferencial é ácido acético. O ácido acético pode ter sido formado por fermentação, ou desnitrificação de restos celulares e utilizado por bactérias *Chloroflexi* presente em Q2.

6. CONCLUSÕES

Dois quimiostatos foram operados durante 316 dias sob mesmas condições, mas diferindo entre si apenas o inoculo, Q1 - lodo de UASB utilizado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves e Q2 – biomassa de reator nitrificante-desnitrificante de indústria produtora de aminoácido. As conclusões obtidas após a operação e monitoramento foram:

- Foi possível enriquecer consórcios microbianos contendo agregados de cocos Gram negativos com morfologia semelhante às bactérias *anammox*;
- A remoção do nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) foi de $51,3 \pm 13,1\%$ e $39,3 \pm 14,4\%$ em Q1 e Q2, respectivamente, na etapa V;
- A remoção de N-NO_2^- foi de $60,5 \pm 9,2\%$ e $53,2 \pm 10,9\%$ para Q1 e Q2 respectivamente, na etapa V;
- Foi detectado nitrato a partir do 274º dia de operação demonstrando que o processo *anammox* ocorreu nos dois quimiostatos;
- O processo *anammox* foi confirmado por análises físico-químicas e moleculares utilizando-se sondas específicas para microrganismos *anammox*;
- O quimiostato Q1 obteve eficiência de remoção de nitrogênio total de $57,1 \pm 4,1\%$, e Q2 eficiência de $43,0 \pm 3,4\%$ para carga nitrogenada total aplicada de $43,5 \pm 1,0$ mg N ($\text{N-NO}_2^- + \text{N-NH}_4^+$)/ L_{reator} .dia.
- Análises da estrutura dos consórcios presentes nos dois quimiostatos revelaram algumas populações favorecidas em detrimento a outras não-aptas às condições *anammox*;
- Duas bandas recuperadas de gel de DGGE situaram-se filogeneticamente próximas às bactérias verdes não-sulfurosas.

7. RECOMENDAÇÕES FUTURAS

- Avaliar a comunidade microbiana presente em reatores inoculados com biomassa

tropical sob condições *anammox* por clonagem e biblioteca genômica;

- Realizar ensaios de atividade *anammox* em batelada;

- Realizar ensaios em batelada verificando-se temperatura e pH ótimos para culturas *anammox* presentes em regiões tropicais;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAPTESTE, E and GRIBALDO, S. (2003). The genome reduction hypothesis and the phylogeny of eukaryotes. *Trends in Genetics* **19** (12): 696-700

BRODA, E. (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* **17**: 491-493.

BROSIUS, J.; PALMER, M.L.; KENNEDY, P.J.; NOLLER, H.F. (1978). Complete sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 4801–4805

BOND, P.L.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, J.; BLACKALL, L.L (1995). Bacterial community structures of Phosphate-Removing and Non-Phosphate-Removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl. Environ. Microbiol* **61**: 1910-1916

DAPENA-MORA, A.; CAMPOS, J.L.; MOSQUERA-CORRAL, A.; JETTEN, M.S.M.; MÉNDEZ, R. (2004). Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. *J. Biotech.* **100**:159-170.

DSM, Scientific Services of Cultures Collections. *Curso Ministrado na Fundação Tropical de pesquisa e tecnologia André Toledo*. Campinas, 1991.

EGLI, K.; BOSSHARD, F.; WERLEN, C.; LAIS, P.; SIEGRIST, H.; ZEHNDER, A.J.; VAN DER MEER, J.R. (2003). Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microb. Ecol.* 45(4): 419-32.

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

FUEST, J.A. (1995). The planctomicetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology UK* **141**: 1493-1506.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. (1998). Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J. Bacteriol.* **180**: 4765-4774.

JETTEN, M.S.M.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; ROBERTSON, L.A.; DEVRIES, S.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G. (1997). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 75-93.

JETTEN, M.S.M.; STROUS, M.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; SCHALK, J.;

VAN DONGEN, U.G.J.M.; VAN DE GRAAF, A.A.; LOGEMANN, S.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G. (1999). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 421-437.

JETTEN M.S.M.; WAGNER, M.; FUERST, J.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; KUENEN, J.G.; STROUS, M. (2001a). Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 283-288.

JETTEN, M. S. M.; VAN DONGEN, L. G. J. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M (2001b). “*The Combined Sharon/Anammox Process*”. Stowa: Foundation for Applied Water Research. IWA Publishing. London.

JETTEN, M.S.M.; SLIEKERS, A.O.; KUYPERS, M.M.M.; THAMDRUP, B.; VAN NITRIK, L.; CIRPUS, I.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; LAVIK, G.; DALSGAARD, T.; WAGNER, M.; SINNINGHE-DAMSTÉ, J.S.; JØRGENSEN, B.B.; KUENEN, J.G.; FUERST, J.; SCHMID, M.; STROUS, M; (2003). Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 107-114.

JIANLONG, W.; JING, K. (2005). The characteristics of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) by granular sludge from an EGSB reactor. *Process Biochemistry* **40 (5)**: 1973-1978.

JONES, M.L.; LIEHR, S.K.; CLASSEN, J.J.; ROBARGE, W. (2000). Mechanisms of dinitrogen gas formation in anaerobic lagoons. *Advan. Environ. Res.* **4**: 133-139.

JURETSCHKO, S.; LOY, ALEXANDER.; LEHNER, A.; WAGNER, M. (2002). The Microbial Community Composition of a Nitrifying-Denitrifying Activated Sludge from an Industrial Sewage Treatment Plant Analyzed by the Full-Cycle rRNA Approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **25 (1)**: 84-99.

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

KIELING. DD. (2004). *Estudo da remoção biológica de nitrogênio a partir de lodo nitrificante cultivado em meio autotrófico sob condições anóxicas*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

KIELING. D.D.; REGINATTO, V.; SCHMIDELL, W.; TRAVERS, D.; MENES, R.J.; SOARES, H.M. (2005). Influence of sludge wash-out on the establishment of

anammox process. *Proceedings of Anaerobic Digestion (DAAL)*. Uruguai 5 a 8 de outubro de 2005.

KUYPERS, M.M.M.; SLIEKERS, A.O.; LAVIK, G.; SCHMID, M.; JØRGENSEN, B.B.; KUENEN, J.G.; SINNINGHE-DAMSTÉ, J.S.; STROUS, M.; JETTEN, M.S.M.; SCHMIDT, I. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black sea. *Nature* **422**: 608-611.

LINDSAY, M.R.; WEBB, R.I.; STROUS, M.; JETTEN, M.S.M.; BUTLER, M.K.; FORDE, R.J.; FUERST, J.A. (2001). Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organization for the bacterial cell. *Arch. Microbiol.* **175**: 413-429.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; & PARKER, J. (2004). *Brock BIOLOGY of MICROORGANISMS*. 10ª edição New Jersey, Printice Hall.

MELVIN, A.N.W.T.; HOBSON, P.P. (1994). Identification of anaerobic digester bacteria using polimerase chain reaction method. *Bioresource Technology* **47**: 73-80.

MULDER, A.; VAN DE GRAAF, A.A.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microb. Ecol.* **16**: 177-183.

NEEF, A; AMAN, R; SCHLESNER, H & SCHLIEFER, KH (1998). Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of planctomycetes with 16S rRNA-targets probes. *Microbiology UK* **144**: 3257-3266.

NIELSEN, AT; LIU, WT; FILIPE, C; GRADY, L; MOLIN, S; STAHL, DA. (1999). Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** 1251-1258.

SCHMID, M.; WALSH, K.; WEBB, R.I.; RIJPSTRA, W.I.C.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; VERBRUGGEN, M.J.; HILL, T.; MOFFERT, B.; FUERST, J.A.; SCHOUTEN, S.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S.; HARRIS, J.; SHAW, P.; JETTEN, M.S.M.; STROUS, M. (2003). Candidatus "Scalindua brodae", sp. Nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp. Nov., Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**: 529-538.

SCHMID, M.; TWACHTMANN, U.; KLEIN, M.; STROUS, M.; JURETSCHKO, S.; JETTEN, M.S.M.; METZGER, J.W.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. (2000). Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.* **23** (1): 93-106

SCHMIDT, I; SLIEKERS, O; SCHMID, M; BOCK, E; FUERST, JA; KUENEN, JG; JETTEN, MSM; STROUS, M (2003). New concepts of microbial treatment processes

for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol. Rev* **27**: 481-492.

SEKIGUCHI, Y.; YAMADA, T.; HANADA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. (2003). *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. *Int. J. Syst. and Evol. Microbiology* **53**: 1843-1851.

SINNINGHE-DAMSTE, J.S.; STROUS, M.; RIJPSTRA, W.I.; HOPMANS, E.C.; GEENEVASEN, J.A.J.; VAN DUIN, A.C.T.; VAN NIFTRIK, L.A.; JETTEN, M.S.M. (2002). Linearly concatenated cyclobutane (ladderane) lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* **419**: 708-712.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (1998). 20th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

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

STROUS, M.; VAN GERVEN, E.; PING, Z.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. (1997b). Ammonium removal from concentrated waste streams with the Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Wat. Res.* **31**: 1955-1962.

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

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

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

STROUS, M.; KUENEN, J.G.; FUERST, J.A.; WAGNER, M.; JETTEN, M.S.M. (2002). The anammox case - A new experimental manifesto for microbiological eco-physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 693-702.

STROUS, M.; PELLETIER, E.; MANGENOT, S. (2006). Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**: 790-794.

THAMDRUP, B.; DALSGAARD, T. (2002). Production of N₂ through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1312-1318.

TOH, S.K.; WEBB, R.I.; ASHBOLT, N.J. (2002). Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters. *Microb. Ecol.* **43**:154–167.

VAN DE GRAAF, A.A.; DE BRUIJN, P.; ROBERTSON, L.A.; JETTEN, M.S.M.; KUENEN, J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology UK* **142**: 2187-2196.

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

VAN DE GRAAF, A.A.; MULDER, A.; BRUIJN, P.; JETTEN, M.S.M.; ROBERTSON, L.A.; KUENEN, J.G. (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1246-1251.

VERSTRAETE, W. ; PHILIPS, S. (1998). Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution* **102**: 717-726.

Anexo

Tabela 1. Valores das concentrações de nitrogênio amoniacal monitorados em Q1 e Q2.

Operação (dias)	Afluentes (mg N-NH ₄ ⁺ /L)	Efluente Q1 (mg N-NH ₄ ⁺ /L)	Efluente Q2 (mg N-NH ₄ ⁺ /L)	Eficiência de remoção Q1 (%)	Eficiência de remoção Q2 (%)
17	74,1	47,7	39,9	35,6	46,2
24	76,9	54,6	38,8	29,0	49,5
30	60,1	55,8	39,9	7,2	33,6
48	48,4	39,3	37,9	18,8	21,7
56	66,3	49,1	49,1	25,9	25,9
61	71,2	52,8	50,5	25,8	29,1
70	57,1	38,1	29,6	33,3	48,2
73	69,8	52,9	50,8	24,2	27,2
87	60,1	32,6	31,3	45,8	47,9
91	55,8	33,8	29,6	39,4	47,0
116	61,3	45,7	43,6	25,4	28,9
123	51,2	30,5	34,7	40,4	32,2
136	73,2	48,2	50,3	34,2	31,3
138	63,5	47,8	49,5	24,7	22,0
144	65,1	46,5	47,4	28,6	27,2
147	65,6	47,4	47,4	27,7	27,7
157	63,9	50,8	47,4	20,5	25,8
161	62,2	50,2	49,2	19,3	20,9
165	67,5	45,3	51,2	32,9	24,1
170	65,2	46,4	45,3	28,8	30,5
175	68,4	46,2	44,8	32,5	34,5
180	65,3	47,2	42,1	27,7	35,5
187	67,8	45,6	43,2	32,7	36,3
194	68,1	44,9	45,6	34,1	33,0
200	67	41,2	41,8	38,5	37,6
203	62,8	44,1	42	29,8	33,1
209	60,1	43,6	43,7	27,5	27,3
218	68,9	47,4	46,9	31,2	31,9
220*	62,7	58,4	58,2	6,9	7,2
224*	65,7	62	59,9	5,6	8,8
227*	69,9	58,2	59,4	16,7	15,0
232*	68,3	61,1	60,2	10,5	11,9
236**	68,2	61	45,2	10,6	33,7
239**	71,2	69	49,4	3,1	30,6
241**	72,1	64,7	45,2	10,3	37,3
243**	67,3	63,1	43	6,2	36,1
247**	27,4	48,4	24,3	-76,6	11,3
252	85,6	62,9	60,9	26,5	28,9
255	74,2	31,2	20,8	58,0	72,0
262	71	33,2	42,7	53,2	39,9
268	82,9	59,6	49,8	28,1	39,9
274	82,4	55,8	66,2	32,3	19,7
276	82,9	40,6	57,8	51,0	30,3
282	80,7	38,5	57,1	52,3	29,2
288	81,0	29,7	46,7	63,3	42,3
292	77,3	28,9	45,1	62,6	41,7
296	75,9	27,6	46,3	63,6	39,0

* período alimentado com afluentes contendo somente amônia.

** período que ocorreu nitrificação nas mangueiras de alimentação.

Tabela 2. Valores das concentrações de nitrogênio na forma de nitrito monitorados em Q1 e Q2.

Operação (dias)	Afluentes (mg N-NO ₂ ⁻ /L)	Efluente Q1 (mg N-NO ₂ ⁻ /L)	Efluente Q2 (mg N-NO ₂ ⁻ /L)	Eficiência de remoção Q1 (%)	Eficiência de remoção Q2 (%)
17	79,0	3,5	16,3	95,5	79,4
21	71,2	19,0	11,2	73,4	84,3
24	67,2	26,2	25,9	61,0	61,5
30	89,3	59,3	91,8	33,5	-2,8
48	92,9	90,9	98,6	2,2	-6,2
56	76,3	78,0	79,6	-2,3	-4,3
70	75,4	90,0	104,9	-19,4	-39,2
73	82,0	96,3	106,1	-17,5	-29,4
74	77,8	67,7	73,4	13,0	5,7
84	85,4	100,3	107,2	-17,5	-25,5
91	79,1	82,5	84,0	-4,3	-6,2
116	77,4	82,2	82,5	-6,3	-6,7
123	65,6	76,2	73,4	-16,2	-11,8
136	64,7	44,9	45,9	30,5	29,0
138	69,7	42,7	45,6	38,7	34,6
144	71,7	8,8	11,5	87,7	83,9
147	70,1	13,1	23,7	81,3	66,1
157	71,2	15,6	21,2	78,1	70,2
161	70,6	17,2	14,7	75,6	79,2
165	78,2	19,8	16,0	74,7	79,5
170	71,6	16,9	15,2	76,4	78,8
175	70,1	17,3	18,3	75,3	73,9
180	74,1	21,3	12,1	71,3	83,7
187	72,3	21,1	16,4	70,8	77,3
194	71,2	16,8	18,2	76,4	74,4
200	68,7	18,3	21,3	73,4	69,0
203	67,0	15,9	19,3	76,3	71,2
209	68,9	16,3	17,2	76,3	75,0
218	70,5	24,1	18,3	65,8	74,0
220*	0,0	7,2	8,1	0,0	0,0
224*	0,0	3,4	2,9	0,0	0,0
227*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
232*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
236**	71,0	15,1	21,7	78,7	69,4
239**	81,5	15,0	20,9	81,6	74,4
241**	89,2	54,3	42,6	39,2	52,2
243**	105,1	79,7	93,5	24,1	11,0
247**	111,9	82,1	99,2	26,6	11,3
252	75,0	58,9	69,1	21,6	7,9
255	70,2	47,6	39,7	32,2	43,4
262	71,2	52,1	41,2	26,8	42,1
268	63,9	62,1	60,9	2,8	4,6
274	72,4	16,4	18,1	77,4	75,0
276	74,1	29,6	36,3	60,1	51,0
282	69,9	33,4	36,8	52,2	47,4
288	71,2	34,1	38,2	52,1	46,3
292	78,2	30,1	37,8	61,5	51,7
296	85,1	34,4	44,5	59,6	47,7

* período alimentado com afluentes contendo somente amônia.

** período que ocorreu nitrificação nas mangueiras de alimentação.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)