



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

CAMILA MICHELS

**EFEITO INIBITÓRIO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA
ATIVIDADE DE BACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIA**

FLORIANÓPOLIS –SC

2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

Camila Michels

EFEITO INIBITÓRIO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA
ATIVIDADE DE BACTÉRIAS OXIDADORAS DE AMÔNIA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Coorientador: Prof. Dr. Pedro J. J. Alvarez

Florianópolis – SC

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Michels, Camila

Efeito Inibitório de Nanopartículas de Prata na Atividade de Bactérias Oxidadoras de Amônia / Camila Michels ; orientador, Hugo Moreira Soares ; coorientador, Pedro J. J. Alvarez - Florianópolis, SC, 2016.

153 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Inibição. 3. Nitrificação. 4. Nanopartículas de prata. 5. Expressão gênica. I. Soares, Hugo Moreira. II. Alvarez, Pedro J.J. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que fizeram parte desta jornada:

Primeiramente ao professor Hugo M. Soares que me orientou, apoiou e disponibilizou o laboratório para o desenvolvimento do trabalho. Não só auxiliando nos assuntos tese, mas também buscando oportunidades para o meu crescimento profissional

Ao professor Pedro Alvarez, por ter me co-orientado e disponibilizado seu laboratório na Rice University para que alguns experimentos fossem realizados. Ao Yu Yang, por ter dividido comigo alguns de seus conhecimentos.

Ao professor Willibaldo Schimidell, pelo apoio na pesquisa e pelos ensinamentos necessários para a realização deste trabalho.

Aos colegas do LTBR que com certeza tornaram os dias no laboratório muito mais leves. Não foram poucos os bons momentos que tivemos. Sempre presentes nos experimentos, cada um auxiliando um pouco, agregando mais conhecimento. Janaína, Naiana, Taíse, Simone, Marcos, Walter, Cris, Diane, Gabi, Cléo, Miriam e Mayara, obrigada por tudo. Sem esquecer das minhas queridas alunas de iniciação científica, Camila, Amanda e Geórgia, obrigada pela ajuda e pelas risadas.

Além dos meus colegas, agradeço a todos aqueles que, mesmo não fazendo parte do nosso grupo de pesquisa, me ajudaram com análises, emprestando equipamentos e reagentes. Não foram poucos, mas não vou citar nomes para não cometer injustiças.

Aos amigos que fiz durante o doutorado sanduíche Márcia, Maria Rita, Jin, Yuan yuan, pela companhia, pelos passeios, pelos momentos de descontração que ajudaram a reduzir a saudade de casa.

À minha família que sempre me apoiou, em todos os momentos, em todas as escolhas que faço. Obrigada!

Ao Mateus, que esteve comigo mais do que ninguém nessa jornada. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”

João Guimarães Rosa

RESUMO

Os nanomateriais estão sendo amplamente utilizados em nosso cotidiano, com diferentes finalidades. A nanopartículas de prata (NPAg) é conhecida por suas propriedades antimicrobianas e é uma das mais comuns em produtos de consumo, tais como tecidos utilizados em roupas para prática de esportes, produtos médicos, produtos para bebês e muitos outros. O uso generalizado de NPAg pode aumentar sua liberação para ambientes naturais e às estações de tratamento de águas residuárias, onde podemos encontrar bactérias do ciclo do nitrogênio. Entre elas são bactérias oxidadoras de amônio (BOA), que são consideradas extremamente sensíveis às mudanças no ambiente. Como as NPAgs afetam a atividade dessas bactérias, importantes agentes reguladores do nitrogênio na natureza, este trabalho visa avaliar sua inibição em processo em batelada e em processo contínuo perante uma cultura pura de *Nitrosomonas europaea* e também uma cultura enriquecida em BOA, utilizando nanopartícula comercial. Para isso foram feitos testes inibição em batelada e em contínuo, de tempo de exposição, testes cinéticos, de microscopia e expressão gênica, expondo a bactéria à NPAg e Ag^+ . Os ensaios com cultura pura, nas concentrações de $0,075 \text{ mgAgNO}_3\text{L}^{-1}$ (íon de prata), $0,075$, $0,25$, $0,50$ e $0,75 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$. Os resultados indicaram que as NPAg apresentam toxicidade elevada sobre a *N. europaea*, reduzido a velocidade de oxidação de amônia de $80,95 \text{ mgNO}_2^-\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ para $46,43 \text{ mgNO}_2^-\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ quando exposto à $0,75 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$ (inibição foi de 42%). A concentração necessária para inibir a atividade em 50% (KI50) foi de $0,85 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$. Íons de prata geraram 100% de inibição da cultura. A expressão gênica corroborou com esses resultados, indicando que existem outros caminhos metabólicos sendo utilizados pela bactéria na presença desse tóxico, podendo haver formação de N_2O , gás do efeito estufa. A cultura mista também apresentou maior suscetibilidade ao Ag^+ do que à NPAg, sendo que a concentração necessária para inibir 50% da atividade foi de $0,36 \text{ mgAgNO}_3\text{.L}^{-1}$ e $10,75 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$, quase 30 vezes maior. Através de imagens produzidas MEV foi possível observar que a NPAg age sobre a membrana celular, causando ruptura da mesma em elevadas concentrações. Já o íon não apresentou danos relevantes à superfície da bactéria, agindo internamente. A comunidade nitritante perdeu atividade após a exposição contínua à $4,35 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$, indicando que o acúmulo de amônia, devido a redução da atividade bacteriana com

consequente esgotamento do sistema estudado. Por fim, um teste de tempo de exposição indicou que a toxicidade da NPAg é exclusivamente dependente da dose aplicada, sendo independente do tempo de exposição.

Palavras-chave: inibição, expressão gênica, nanopartículas de prata, nitrificação, bactérias oxidadoras de amônia.

ABSTRACT

Nanomaterials are being widely used in our daily lives, with different purposes. Silver nanoparticle (NPAg) is known by its antimicrobial properties and is one of the most common in consumer products, such as sports cloths, medical products, baby products and many others. The widespread use of NPAg can increase its release to natural environments and to wastewater treatment plants (WWTP), where we can find bacteria from the Nitrogen cycle. Among them are ammonia oxidizing bacteria (AOB), that are considered extremely sensitive to environment changes. NPAg can affect the activity from this group of bacteria, and disrupt the nitrogen cycle. Therefore, this work's objective was to evaluate the inhibition caused by NPAg during batch and continuous experiments towards a pure culture of *Nitrosomonas europaea* and also to an enriched culture AOB, using a commercial silver nanoparticles. Several tests were performed, such as: batch assays and continuous tests, dose and contact time batches, among other tests in order to try to understand the mechanism behind this inhibition. Pure culture batches were exposed to $0.075 \text{ AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (silver ion), 0.075 , 0.25 , 0.50 e $0.75 \text{ mgAg_NPAg} \cdot \text{L}^{-1}$. Nitrite production rate, fluorescence microscopy analysis and molecular biological methods were used to verify the toxic effect of those concentrations of silver. Results pointed out that NPAg cause inhibition of *N. europaea*, reducing ammonia oxidation rate from $80.95 \text{ mgNO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, in control, to $46.43 \text{ mgNO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ when exposed to $0.75 \text{ mgAg_NPAg} \cdot \text{L}^{-1}$ (42% of inhibition). NPAg concentration needed to reduce bacterial activity in 50% (KI50) was $0.85 \text{ mgAg_NPAg} \cdot \text{L}^{-1}$. Silver ions caused 100% of inhibition. Gene expression corroborates with these results, indicating that there are other metabolic pathways being used by the bacteria in the presence of this toxic compound, with possible formation of N_2O , a greenhouse gas. The mixed culture also showed higher susceptibility to silver ion than NPAg. Wherein the KI50 was $0.36 \text{ mgAgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ and $10.75 \text{ mgAg_NPAg} \cdot \text{L}^{-1}$, almost 30 times higher. SEM images showed how NPAg generates pints and breakage of cell membrane in when exposed to high concentrations of NPAg. However, Ag^+ did not cause damage the surface of the bacteria, acting internally. The nitrifying community lost activity after continuous exposure to $4.35 \text{ mgAg_NPAg} \cdot \text{L}^{-1}$, ammonia accumulated, generating being toxic to the culture. Finally, a contact time test shown that the inhibition caused by NPAg is exclusively dependent of the dose and independent of the exposure time.

Palavras-chave: Inhibition, silver nanoparticles, gene expression, ammonia oxidizing bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida dos nanocompostos (adaptado de SOM et al.,2011).....	35
Figura 2 Esquema representativo do ciclo do Nitrogênio. Processo de assimilação está em verde, dissimilatório em cinza. As demais cores representam processos relatados recentemente. As flechas pontilhadas indicam trocas entre o meio aeróbio e anaeróbio. RDNA – Redução Dissimilatória do Nitrato para Amônia (adaptado de THAMDRUP, 2012).	38
Figura 3 Porcentagem de amônia livre e ácido nitroso como N, em relação a concentração de íon amônio e nitrito presente (SCHMIDELL e REGINATTO, 2007).....	41
Figura 4 Etapas da reação de nitrificação e seus caminhos metabólicos (adaptado de CHANDRAN et al., 2011).....	43
Figura 5 Frascos de cultivo utilizados para os ensaios de inibição em batelada sobre cultura pura.....	58
Figura 6 Esquema ilustrativo do reator A.....	66
Figura 7 Foto do Reator B.....	66
Figura 8 Esquema de operação do reator B, onde ↓ representa o início da adição de meio nutritivo; demonstra os períodos aerados e demonstra os períodos em anaerobiose.	67
Figura 9 Produção de nitrito durante os 7 dias de cultivo da <i>N. europaea</i>	79
Figura 10 Correlação entre o grau de inibição da atividade da cultura pura de <i>Nitrosomonas europaea</i> e a concentração de NPAg.	80
Figura 11 Variação da concentração do íon de prata liberado para o meio, ao longo do tempo, para diferentes concentrações de NPAg, em cultivos contendo <i>N. europaea</i> . As barras indicam o desvio padrão.....	84
Figura 12 Expressão dos genes funcionais da <i>Nitrosomonas europaea</i> após a exposição ao íon de prata e duas concentrações de NPAg.	85
Figura 13 Concentração das formas nitrogenadas ao longo da operação do reator para enriquecimento em BOA. Fase I – mudança de meio; fase II – operação do reator com aproximadamente 700 mg N_ NH ₄ ⁺ .L ⁻¹ e fase III – redução de carga do reator (100 mg N_ NH ₄ ⁺ .L-1). Onde N_ NH ₄ ⁺ S – concentração de íon amônio na saída do reator; N_ NH ₄ ⁺ E - concentração de íon amônio na entrada do reator; N_ NO ₂ S - concentração de nitrito na saída do reator; N_ NO ₃ S - concentração de nitrato na saída do reator.	88

Figura 14 Imagens da nanopartícula de prata obtidas através do MET. (a) Microfotografia com escala de 100 nm; (b) microfotografia com escala de 50 nm.	91
Figura 15 Distribuição de tamanho das nanopartículas.	92
Figura 16 Consumo de amônio pelas BOA em função do tempo, em diferentes concentrações de NPAg.	93
Figura 17 Produção de nitrito durante a exposição da cultura nitritante à NPAg.	94
Figura 18 Correlação entre o grau de inibição da atividade das bactérias e a concentração de NPAg.	95
Figura 19 Consumo de amônio pelas BOA em função do tempo, em diferentes concentrações de Ag^+	98
Figura 20 Produção de nitrito durante a exposição da cultura nitritante à Ag^+	98
Figura 21 Correlação entre o grau de inibição da atividade das bactérias e a concentração de Ag^+	99
Figura 22 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), de amostras de biomassa expostas à (a) 0 mg $Ag.L^{-1}$ (controle); (b) 5 mg $Ag_NPAg.L^{-1}$; (c) 10,75 mg $Ag_NPAg.L^{-1}$; (d) 30 mg $Ag_NPAg.L^{-1}$; (e) 0,1 mg $Ag^+_AgNO_3.L^{-1}$; (f) 0,357 mg $Ag^+_AgNO_3.L^{-1}$ e (g) 0,8 mg $Ag^+_AgNO_3.L^{-1}$	103
Figura 23 Monitoramento das formas nitrogenadas no efluente do reator durante o ensaio de inibição em processo contínuo controle (sem prata) e com NPAg (4,53 mg $Ag_NPAg.L^{-1}$).	105
Figura 24 Variação da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do ciclo de operação, durante a etapa controle (a) e após a adição de NPAg (b) (4,53 mg $Ag_NPAg.L^{-1}$).	107
Figura 25 Monitoramento das formas nitrogenadas no efluente do reator durante o ensaio de inibição em processo contínuo controle (sem prata) e com NPAg (1,32 mg $Ag_NPAg.L^{-1}$).	109
Figura 26 Variação da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do ciclo de operação, durante a etapa controle (a) e após a adição de NPAg (b) (1,32 mg $Ag_NPAg.L^{-1}$).	110
Figura 27 Consumo do íon amônio durante diferentes tempos de exposição, sendo a Figura (a) o controle e (b) exposto a 4,53 mg $Ag_NPAg.L^{-1}$. Onde T1 – biomassa exposta por 1 dia; T2 – por 2 dias; T3 – por 3 dias; T4 – por 4 dias e T5 – por 5 dias.	114
Figura 28 Consumo do íon amônio durante diferentes tempos de exposição, sendo a Figura (a) o controle, (b) exposto a 1,32	

mgAg_NPAg.L⁻¹ e (c) exposto a 2,56 mgAg_NPAg.L⁻¹ Onde T1 – biomassa exposta por 1 dia; T2 – por 2 dias; T3 – por 3 dias; T4 – por 4 dias e T5 – por 5 dias. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Meio nutritivo 2265 para a bactéria ATCC 19718	56
Tabela 2 Concentrações de íons de prata e nanopartículas de prata utilizadas no ensaio de inibição em batelada de sobre cultura pura.	58
Tabela 3 Primers utilizados na análise de expressão gênica	63
Tabela 4 Composição do meio de cultura sintético para cultura mista.	64
Tabela 5 Composição da solução de micronutrientes para cultura mista.	65
Tabela 6 Condições de cultivo dos reatores nitritantes	67
Tabela 7 Concentrações de nanopartícula de prata utilizadas em ensaio de inibição em batelada.	69
Tabela 8 Concentrações de nitrato de prata utilizadas em ensaio de inibição em batelada.	69
Tabela 9 Porcentagem de células não coradas pelo corante DAPI.....	77
Tabela 10 Velocidade de produção de nitrito pela <i>Nitrosomonas europaea</i> e a respectiva inibição.	79
Tabela 11 Concentração de íons de prata liberados de nanopartículas de prata.	82
Tabela 12 Velocidades específicas de produção de nitrito nos ensaios de inibição em batelada das BOA com NPAg.	94
Tabela 13 Concentração de íons de prata liberada da NPAg em cada ensaio.....	97
Tabela 14 Velocidades específicas de produção de nitrito nos ensaios de inibição em processo em batelada das BOA com Ag^+ ($AgNO_3$).....	99
Tabela 15 Velocidades específicas de consumo de oxigênio antes e após a adição de NPAg ($4,53\text{ mg Ag_NPAg.L}^{-1}$).....	108
Tabela 16 Velocidades específicas de consumo de oxigênio antes e após a adição de NPAg ($1,32\text{ mg Ag_NPAg.L}^{-1}$).....	111
Tabela 17 Velocidade de consumo de íon amônio em diferentes tempos de exposição ($4,53\text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$).....	115
Tabela 18 Velocidade de produção de nitrato em diferentes tempos de exposição ($4,53\text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$).....	115
Tabela 19 Velocidade de consumo de íon amônio em diferentes tempos de exposição ($1,32\text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$ e $2,56\text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$).....	117
Tabela 20 Velocidade de produção de nitrato em diferentes tempos de exposição ($1,32\text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$ e $2,56\text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$).....	117
Tabela 21 Variação da concentração de nitrogênio amoniacal em ensaio abiótico com NPAg	145

Tabela 22	Varição do pH em ensaio abiótico com NPAg.....	145
Tabela 23	Varição do OD em ensaio abiótico com NPAg.....	145
Tabela 24	Varição da concentração de nitrogênio amoniacal em ensaio abiótico com Ag ⁺	146
Tabela 25	Varição do pH em ensaio abiótico com NPAg.....	146
Tabela 26	Varição do OD em ensaio abiótico com NPAg.....	147

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

$\Delta\Delta C_{T, \text{gene alvo}}$ – Variação entre os C_t (cycle threshold) da amostra que exposta à prata e ao controle, sem a prata;

Ag_NPAg – Concentração de prata na forma de nanopartículas de prata;

Ag^+ – íon de prata;

$Ag^+ AgNO_3$ – Concentração de íons de prata da forma de nitrato de prata;

AMO - Enzima amônia monooxigenase;

BOA – Bactérias oxidadoras de amônia ;

BON – Bactérias oxidadoras de nitrito;

CASAN - Companhia de Saneamento de Água e Esgoto de Santa Catarina;

CLP – Controlador Lógico Programável;

CML - Concentração mínima letal;

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente;

$C_{T, \text{gene alvo}}$ - *Cycle Threshold* do gene alvo;

$C_{T, \text{gene constitutivo}}$ - *Cycle Threshold* do gene constitutivo;

DAPI – 4'-6 - diamidino-2-fenilindol;

DGGE - Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante;

FISH - *Fluorescent in Situ Hybridization*;

GA - Goma arábica;

HAO - Hidroxilamina oxidoreductase;

HMDS - Hexadimetil disilazona;

ICP-MS - Espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado;

KI50 – Concentração para inibir 50% da atividade bacteriana;

LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica;

MET – Microscópio eletrônico de transmissão;

MEV – Microscopia eletrônica de varredura;

$N_NH_4^+$ - Concentração de nitrogênio na forma de íon amônio ($mgN_NH_4^+.L^{-1}$);

$N_NO_2^-$ - Nitrogênio na forma de nitrito ;

$N_NO_3^-$ -Nitrogênio na forma de nitrato;

NP – Nanopartícula;

NPAg – Nanopartícula de prata;

OD – Oxigênio dissolvido;

PCR – Reação em cadeia da polimerase;

PVP - Polivinilpirrolidona;

qPCRQ – Reação em cadeia da polimerase em tempo real;
 r_{no_2} – Velocidade de produção de nitrito ($\text{mgN_NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$);
RT-qPCR-Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa;
SHARON - *Single Reactor High Activity Ammonia Removal Over Nitrite*;
SST – Concentração de sólidos suspensos totais ($\text{gSST} \cdot \text{L}^{-1}$);
SSV – Concentração de sólidos suspensos voláteis ($\text{gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$);
THR - Tempo de retenção hidráulica (d);
V – Volume útil do reator (L);
 X_a - Número de bactérias marcadas pelo DAPI nas amostras expostas à NPAg e ao Ag^+ ;
 X_c -Número de bactérias marcadas pelo DAPI nas amostras controle, sem prata;
 Y_D - Porcentagem de células não marcadas pelo DAPI (%).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	31
3.1.1	<i>Síntese da NPAg e influência de suas características no efeito tóxico</i>	32
3.1.2	<i>Riscos ao meio ambiente e à saúde humana</i>	35
3.2	CICLO BIOQUÍMICO DO NITROGÊNIO.....	37
3.2.1	<i>Nitrificação</i>	39
3.3	MECANISMOS DE INIBIÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE PRATA	43
3.4	NANOPARTÍCULAS DE PRATA E SUAS IMPLICAÇÕES NA NITRIFICAÇÃO	46
3.5	USO DE MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	50
4	METODOLOGIA	55
4.1	CULTIVO DE CULTURA PURA DE <i>NITROSOMONAS EUROPAEA</i>	55
4.2	MEIO DE CULTIVO	55
4.3	NANOPARTÍCULA DE PRATA E NITRATO DE PRATA	56
4.3.1	<i>Para os ensaios com cultura pura</i>	56
4.3.2	<i>Para os ensaios com cultura mista</i>	56
4.4	TESTE DE INIBIÇÃO EM BATELADA PARA CULTURA PURA.....	58
4.4.1	<i>Deteção de nitrito</i>	59
4.4.2	<i>Microscopia de fluorescência</i>	59
4.4.3	<i>Liberção de prata</i>	60
4.4.4	<i>Extração de RNA– Efeito da prata (NPAg e Ag⁺) na expressão dos genes</i>	60
4.5	ANÁLISES COM CULTURA MISTA	63
4.5.1	<i>Cultura mista</i>	63
4.5.2	<i>Determinações físico-químicas do meio, do efluente do reator e dos ensaios cinéticos</i>	72
4.6	TRATAMENTO DOS DADOS	74
4.6.1	<i>Cálculo da viabilidade celular</i>	74
4.6.2	<i>Velocidade de produção de nitrito</i>	75
4.6.3	<i>Velocidade de consumo de íon amônio</i>	75

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
5.1	CULTURA PURA	77
5.1.1	<i>Análise de viabilidade celular</i>	77
5.1.2	<i>Formação de nitrito</i>	78
5.1.3	<i>Liberação de prata</i>	82
5.1.4	<i>Efeito da Nanopartícula de Prata e do Íon de prata na expressão gênica</i>	85
5.2	CULTURA MISTA.....	87
5.2.1	<i>Estabelecimento de um reator enriquecido em biomassa nitritante</i>	87
5.2.2	<i>Caracterização da nanopartícula de prata.....</i>	90
5.2.3	<i>Inibição em processo em batelada sobre a comunidade nitritante enriquecida.....</i>	92
5.2.4	<i>Inibição em processo contínuo da nanopartícula de prata sobre a cultura de bactérias nitritantes.....</i>	104
5.2.5	<i>Influência do tempo de exposição sobre comunidade nitrificante</i>	113
5.3	COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS COM CULTURA PURA E MISTA.....	118
6	CONCLUSÕES	121
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	123
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
9	ANEXO	145
9.1	ANEXO 1- ENSAIO ABIÓTICO	145
9.1.1	<i>Teste abiótico com nanopartículas de prata.....</i>	145
9.1.2	<i>Teste abiótico com íons de prata</i>	146
9.2	ANEXO 2- LAUDO DE CONTROLE DE QUALIDADE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA	149

1 INTRODUÇÃO

Partículas que possuem tamanho entre 1 e 100 nm, são chamadas nanopartículas. Essas estão cada vez mais presentes no nosso cotidiano, em produtos químicos, em equipamentos médicos e em produtos de consumo direto (protetores solares, tintas, tecidos, utensílios de cozinha, entre outros). Nanomateriais possuem potencial para melhorar a qualidade do ar, da água e do solo. Porém, a produção, uso e disposição devem ser controlados, uma vez que, apesar de possuir aplicações benéficas, eles podem ser prejudiciais tanto para o homem quanto para o meio ambiente (BISWAS e WU, 2005).

O consumo de nanopartículas em bens de consumo ainda é crescente. Em 2006 o inventário publicado pelo projeto chamado *The Project on Emerging Nanotechnologies* (<http://www.nanotechproject.org/news/archive/9231/> - acessado dia 02/06/2013; WIJNHOFEN et al., 2009) apontava 212 produtos com nanopartículas na sua composição e, se continuarmos com o mesmo nível de crescimento que temos hoje, em 2020 serão 3400 produtos consumíveis com nanopartículas. No mesmo documento, a organização indica que as nanopartículas de prata, devido suas propriedades antimicrobianas, são as mais utilizadas em produtos de consumo direto (24% dos itens listados no inventário). O mesmo projeto (<http://www.nanotechproject.org>) apresenta documento com as mais diversas aplicações de nanopartículas de prata, desde embalagens de produtos alimentícios, produtos esportivos (toalhas e tecidos), meias, mamadeiras, canecas, produtos de computação, películas para proteger telefones celulares, entre outros. Deste modo, observa-se que cada vez mais a nanotecnologia está presente no nosso dia-a-dia. Porém, como isso pode afetar a nossa saúde e o meio ambiente tem sido uma questão indagada em pesquisas recentes (MORONES et al., 2005; PANYALA et al., 2008; QUADROS et al., 2010; LOWRY et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014).

Pesquisas mostraram que a nanopartícula é liberada desses produtos em meios líquidos, principalmente. Benn e Westerhoff (2008) afirmaram que até $1,3 \text{ mgAg.L}^{-1}$ foram liberadas para a água de lavagem de meias com NPAg. Kaegi e colaboradores (2010) detectaram a liberação de $0,145 \text{ mgAg.L}^{-1}$ de fachadas pintadas com tintas com propriedades antimicrobianas para águas de chuvas. Como a prata é um ótimo agente antibacteriano, porém não seletivo, é capaz de prevenir contaminações bacterianas (hospitais e cozinhas) e também pode afetar comunidades microbianas fundamentais na natureza, como as bactérias do ciclo do nitrogênio, presentes no solo e também em sistemas de tratamento de efluentes líquidos. Deste modo, pesquisas vem sendo

realizadas para verificar como tais nanopartículas afetam o sistema de lodos ativados, na remoção de matéria orgânica, na nitrificação (ZHANG et al, 2014; YANG et al., 2014; ALITO e GUNSH, 2013) e também culturas puras de bactérias pertencentes ao ciclo do nitrogênio (YANG et al, 2013a). Em geral, o uso das bactérias nitrificantes por esses autores é justificado pelo seu conhecido metabolismo e também por serem indicativos de toxicidade a estes tipos de sistemas (CARUCCI et al., 2006).

Dentre as metodologias para verificar essa inibição usualmente aplicam-se testes cinéticos, medindo-se consumo de substratos e formação de produtos. Tais testes, avaliam o processo na forma de causa e efeito, não expressando na realidade onde exatamente o composto tóxico está provocando o efeito da inibição. Metodologias de biologia molecular vem despontando nos trabalhos que estudam efeitos inibitórios em bactéria. A expressão dos genes permite verificar quais genes são estimulados ou não em determinadas situações adversas ao microrganismo, apontando qual rota metabólica está sendo utilizada, qual está sendo reprimida ou estimulada. Esse método se chama reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR), o qual é utilizado em culturas puras de bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio (YANG et al., 2012b).

Entretanto, ainda não foi apresentado na literatura dados que verifiquem a toxicidade de culturas mistas de bactérias oxidadoras de amônia, utilizando cinéticas de inibição em batelada e em processo contínuo Também não foram detectados nos estudos que analisam a relação entre parâmetros cinéticos com a expressão gênica

O Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR), pertencente ao EQA (UFSC), vem pesquisando a influência de micro poluentes sobre comunidades bacterianas presentes em tratamento de efluentes. Foi concluído um trabalho que avaliou a influência do antibiótico sulfato de colistina sobre processos microbiológicos de tratamento de efluentes, avaliando a toxicidade aguda e crônica sobre bactérias nitrificantes e metanogênicas (BRESSAN, 2012). Mais recentemente, foram pesquisados outros compostos que estão despontando como possíveis tóxicos para processos biológicos. Uma dissertação de mestrado, já disponível para consulta, verificou o efeito de nanopartículas de ferro sobre bactérias oxidadoras de amônia (PERAZZOLI, 2015). Na mesma linha, foi desenvolvido este trabalho, onde nanopartículas de prata, conhecidamente um agente antimicrobiano, foram utilizadas para os ensaios com bactérias oxidadoras de amônia. Para aprofundar a pesquisa, principalmente na

área de biologia molecular, fiquei um ano desenvolvendo minha pesquisa na Rice University (TX, EUA), sob orientação do professor Pedro J.J. Alvarez.

Assim, no presente trabalho será investigado a inibição de nanopartículas de prata sobre culturas de bactérias oxidadoras de amônia, pura e mista, através de testes de em batelada e em processo contínuo, relacionando os resultados cinéticos, com dados de expressão gênica dos genes envolvidos no processo de nitrificação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a inibição em processo em batelada e em processo contínuo de nanopartícula de prata comercial sobre bactérias oxidadoras de amônia, cultivadas em condições controladas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma cultura mista de bactérias oxidadoras de amônia (nitritantes) em um reator, em escala de bancada, operado em bateladas sequenciais, visando a obtenção de biomassa para os testes de inibição sobre essa cultura;

- Avaliar a inibição em batelada de diferentes concentrações de nanopartícula de prata sobre uma cultura pura de *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718) e uma cultura mista enriquecida em bactérias oxidadoras de amônia;

- Avaliar a inibição em processo contínuo de nanopartícula de prata em reator nitritante operado em contínuo;

- Avaliar o efeito do tempo de exposição de diferentes concentrações de nanopartícula de prata sobre a cultura mista enriquecida de bactérias oxidadoras de amônia (BOA).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Nanotecnologia é definida como a síntese, projeto e aplicação de materiais e instrumentos cujo formato e tamanho foram criados em escala nanométrica, que compartilham de propriedades físicas, químicas, elétricas e mecânicas, diferentes das propriedades do mesmo material com dimensões não nanométricas (BUZEA et al., 2007). De acordo com Bhushan (2010), nanopartículas são agregados de átomos ligados com pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nm, tipicamente com $10 - 10^5$ átomos. Tais nanomateriais são utilizados nas mais diversas funções, desde produtos diretamente ao consumidor final, como roupas e utensílios domésticos; usos na medicina, fármacos, na conservação de alimentos e com ação antimicrobiana (BENN e WESTERHOFF, 2008; QUADROS et al., 2013; SALATA, 2004; KIM et al., 2007). Entre os produtos com ação antimicrobiana está a nanopartícula de prata (NPAg), que aparece em 24% dos produtos com nanomateriais (www.nanoproject.org, acessado 02/06/2013).

A prata, coloidal ou na forma iônica, como composto antimicrobiano, é utilizada desde a antiguidade. Já era empregada na fabricação de jarras para a armazenagem de água pelos egípcios e, também, era conhecida pelos romanos para prevenir infecções de ferimentos. Foi utilizada na primeira guerra mundial, antes da descoberta do antibiótico (EL-BADAWY et al., 2010, REIDY et al., 2013). Avanços recentes em nanotecnologia ressaltaram o uso da prata para o mesmo fim, na forma de nanopartículas (RADNIECKI et al., 2011).

Nanopartícula de prata pode ser recoberta por diversos materiais a fim de deixá-la mais estável. Já foram relatados os mais diversos usos, entre eles, curativos, utensílios de cozinha, como tábua de cortar carnes e talheres, chupetas para bebês, mamadeiras, na fabricação de tecidos utilizados em artigos esportivos, entre outros (MORONES et al., 2005; PANYALA et al., 2008; QUADROS et al., 2010).

A seguir serão abordadas algumas questões relevantes sobre a nanopartícula de prata, bem como riscos do seu uso, forma de preparo e, também, algumas características específicas.

3.1.1 Síntese da NPAg e influência de suas características no efeito tóxico

O modo como a nanopartícula é sintetizada é o que define algumas de suas propriedades. Variações no pH, temperatura, concentração do composto utilizado como fonte de prata, entre outros fatores, influenciam o tamanho, a forma e a estabilidade da NP. A síntese pode ser química, biológica (extratos de sistemas vivos) ou física, sendo o processo biológico considerado o menos agressivo para o meio ambiente. Dentre esses tipos, existem várias técnicas para a produção de NPAg e algumas delas serão brevemente descritas aqui.

Um dos sais mais utilizados como precursor de metal para formação de NPAg é o nitrato de prata. Para a reação é necessário um agente redutor, citrato de sódio, borohidreto de sódio e hidrogênio elementar, entre outros, que tenha elétrons disponíveis para reduzir os íons de prata, formando a nanopartícula (SONG et al., 2009; ABOU EL-NOUR et al., 2010). Quanto mais forte o agente redutor, mais rápida a reação, menor poderá ser a partícula. Compostos tamponantes são utilizados para estabilizar a partícula (EL-BADAWY et al., 2010). Um indicativo que a reação está ocorrendo, formando NPAg, é a coloração marrom amarelada que a solução adquire.

A nanopartícula de prata pode ser sintetizada de diversas maneiras e, portanto, ter diversos tamanhos, formas e revestimentos. Arnaout e Gunsch (2012) prepararam duas, das três NPAg testadas por eles, com revestimento de goma arábica (GA), citrato de sódio e polivinilpirrolidona (PVP). Para prepará-las foi necessário, basicamente, adicionar nitrato de prata, água e citrato ou goma arábica. Pode-se explicar, em linhas gerais que, para preparar a NPAg basta reduzir o nitrato de prata, em água, com citrato de sódio, o qual, além de servir como agente redutor, tem a função de estabilizar a partícula. A concentração de citrato utilizada influencia também o tamanho da partícula (HENGLEIN e GIERSIG, 1999). A NP revestida por GA é produto da mistura de goma arábica, água e nitrato de prata, agitando e aquecendo, com posteriores centrifugações para separar a NP formada, que é ressuspensa em água (ARNAOUT e GUNSCH, 2012). A outra NP testada por eles é disponível comercialmente, revestida de PVP, fornecida pela *Nanostructured & Amorphous Materials* (Houston, TX). Os tamanhos foram, $25,2 \pm 9,3$ nm, $27 \pm 6,5$ nm e 21 ± 17 nm, para citrato, goma arábica e PVP, respectivamente. Os autores observaram que a NPAg com revestimento de citrato, liberou mais Ag^+ que as demais, entretanto a revestida por PVP, formou aglomerados. Assim como nesse caso, outros estudos utilizam outros agentes redutores, tais

como hidrazina, utilizando dodecetil sulfato de sódio como estabilizante (GUZMÁN et al., 2008), boroidreto de sódio (SONG et al., 2009), entre outros. A maneira de executar a reação pode variar conforme o caso.

Outra maneira de se obter NPAg é a biossíntese. É um processo confiável e de baixo impacto ambiental. Organismos como fungos, bactérias, vírus, diatomáceas, plantas, ou ainda processos que utilizam compostos isolados desses seres vivos, podem ser utilizados para produzir nanopartículas (NPAg), tanto intra como extracelularmente (FAYAZ et al., 2010; GURUNATHAN et al., 2009; KHALIL et al., 2013; NAZERUDDIN et al., 2014).

Quando formado externamente, as NPAg são produtos do cultivo desses organismos ou extrato de plantas, que possuem substâncias redutoras, capazes de reduzir o sal de prata, produzindo a nanopartícula. Um exemplo é o uso do extrato das folhas de *Azadirachta indica* (Nim) como fonte do composto redutor, capaz de reduzir AgNO_3 em no máximo 2 horas, sendo que o mesmo extrato possui proteínas que agem como um bioligante, protegendo as NPs, evitando a aglomeração. Além disso, produzem um composto capaz de tamponar o meio e controlar assim seu tamanho e forma (NAZERUDDIN et al., 2014). Mustafa e colaboradores, (2013) produziram NPAg a partir de extrato de folhas de oliveiras, que por si só já possuem potencial antimicrobiano. Em ambos os casos, as partículas formadas apresentaram boa estabilidade e tiveram boa distribuição de tamanho.

Outros autores também sintetizaram NPAg a partir de bactérias. Klaus e colaboradores (1999) produziram a partícula internamente, no espaço periplasmático da bactéria *Pseudomonas stutzeri* AG259. Porém, nesse caso, a purificação da NP é mais difícil de que quando ela é produzida externamente. Castro-Longoria e colaboradores (2011) sintetizaram internamente e externamente nanopartículas de ouro e de prata, utilizando o fungo filamentosso *Neurospora crassa*. Após o processo de cultivo e crescimento do fungo, este foi filtrado e lavado, somente depois disso foi exposto ao nitrato de prata. Em ambos os casos, os autores citam a presença de agentes redutores próximo a parede celular.

Há ainda o método físico de produção de NPAg, porém, é menos difundido na literatura. Neste método o metal pode ser evaporado e condensado em substrato específico (RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al., 2000), porém, esse tipo de produção é cara e demorada, portanto, pouco utilizada (EL-NOUR et al., 2010). As nanopartículas de prata podem ser produzidas através da subdivisão de aglomerados metálicos através da pulverização ou da descarga de arco entre eletrodos metálicos,

produzindo partículas mais puras, devido à ausência de produtos químicos (KHOLUD et al., 2010; ASHKARRAN, 2010).

É sabido que o efeito tóxico da nanopartículas de prata depende do tamanho da partícula, do revestimento, da forma, atrelando isso a capacidade de maior ou menor liberação de íons de prata (Ag^+), considerados, muitas vezes, mais tóxicos que as NP_{Ag} (XIU, et al., 2011).

Pal e colaboradores (2007) investigaram a inibição da nanopartícula de prata nas diferentes formas, perante a *Escherichia coli*, uma bactéria gram-negativa. Testaram os formatos: esférico, com ± 39 nm, alongado (como um bastão), com ± 133 nm de comprimento e ± 16 nm de diâmetro, respectivamente, e outro triangular, com o lado medindo ± 40 nm. Para as triangulares, a massa de 1 μ g inibiu quase completamente a cultura. Para as esféricas, 12,5 μ g de NP_{Ag} reduziu o número de colônias, mas aproximadamente 100 μ g foi necessária para a total inibição. Já para as em formas de bastões, com 100 μ g ainda havia crescimento bacteriano na placa. Eles atribuem essa diferença de nível de inibição ao número de lados ativos em cada NP_{Ag} estudada.

O tamanho da NP também pode influenciar no grau de inibição. Carlson e colaboradores (2008) apontaram que um dos mecanismos de inibição das NP_{Ag}, em células pulmonares, é o estímulo da produção de espécies reativas de oxigênio por partículas com 15 nm. As demais partículas testadas, com 30 nm e 55 nm, também apresentaram efeito inibitório, porém, em menor escala. Quanto maior o tamanho, menor o número de células que sofreram danos. A NP de 30 nm apresentou danos na função da mitocôndria e na integridade da membrana celular. Para a de 50 nm, os mesmos danos, porém, em menor intensidade. Tuttle (2012) demonstrou que a inibição está relacionada à maior área superficial e não a maior massa ou número de nanopartículas na solução.

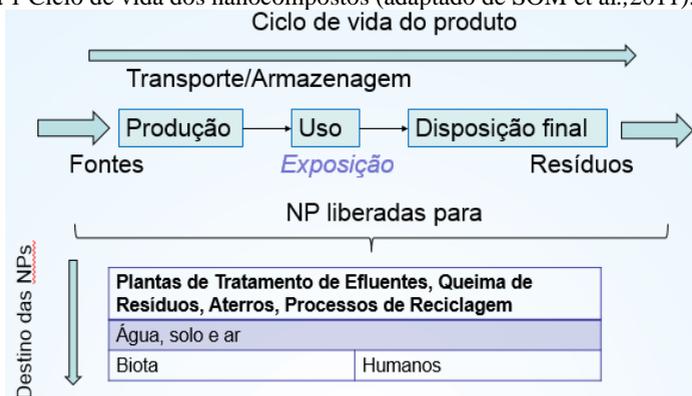
Outros estudos indicam que o verdadeiro causador de inibição é o íon de prata e não a nanopartícula, em testes considerando que em ambientes aerados, o íon é liberado facilmente da NP_{Ag} (XIU et al., 2012). Entretanto, muitos outros estudos mostram exatamente o oposto, indicando que a nanopartícula em si, é mais tóxica que o íon (CHOI et al., 2008; ARNAOUT e GUNSCH, 2012), sendo esta questão ainda aberta para discussão.

3.1.2 Riscos ao meio ambiente e à saúde humana

O uso de nanopartículas, particularmente, as nanopartículas de prata, aumenta o risco da contaminação do meio ambiente devido a sua ação bactericida. Benn e Westerhoff (2008) demonstraram que meias contendo nanopartículas de prata podem perder 100% das NPAG (equivalente a até $1,3 \text{ mgL}^{-1}$) em quatro lavagens, e essas partículas serão, eventualmente, direcionadas para água, solo ou para sistemas de tratamento biológico de efluente. As bactérias presentes nestes ambientes poderão ter a sua atividade impactada e, ainda, sofrer seleção, permanecendo apenas aquelas resistentes à ação das NPAG (GUPTA e SILVER, 1998).

A Figura 1 indica a rota de interação de nanocompostos com o ambiente (SOM et al., 2011). Os autores apontam que em toda cadeia de produção e consumo de nanomateriais ocorre o risco de liberação não intencional, podendo gerar prejuízos à biota e a saúde humana, como problemas de pele e gastrointestinais. O ciclo de vida dos nanomateriais ainda é considerado pouco conhecido, sabe-se que a NPAG pode sofrer interações, dissolução, oxidação, se transformando, modificando a sua forma de atuação, não se sabe ainda como isso pode afetar o ambiente (MITRANO et al., 2015). Devido a isso, se faz necessário compreender como esses novos micropoluentes agem sobre os microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica e nutrientes.

Figura 1 Ciclo de vida dos nanocompostos (adaptado de SOM et al.,2011).



O tratamento de resíduos sólidos de produtos contendo nanopartículas também deve ser considerado. Um recente estudo indicou que grande parte dos produtos contendo “nanomateriais

engenheirados” não são corretamente dispostos ao final do seu uso. Sofrem reciclagem, são incinerados ou vão para aterros, sendo esse o ponto mais crítico pois pode levar a contaminação de corpos hídricos (CABALLERO-GUZMAN et al., 2015).

Pesquisas tem sido realizadas com o intuito de verificar como nanopartículas liberadas no ciclo de vida influenciam os mais diversos seres. Nesses estudos, em geral, são levadas em consideração as concentrações de nanopartículas que foram encontradas em rios e efluentes ou ainda, concentrações de NPAg lixiviadas de produtos que as contém.

Morones e colaboradores (2005) pesquisaram o efeito tóxico da prata em bactérias gram-negativas. Detectaram que as partículas menores que 10 nm são capazes de se fixar na superfície da bactéria, impedindo a respiração e a permeabilidade e, também, são capazes de penetrar dentro da bactéria, podendo interagir com compostos de enxofre e fósforo (como o DNA), com potencial de causar danos a essas moléculas e, assim como outros estudos, apontaram o íon prata como o agente que contribui para a inibição pela NPAg. Kaegi e colaboradores (2011) acompanharam o comportamento de NPAg em uma planta de tratamento de esgotos, composto de tanques aeróbios e anaeróbios. No tanque anaeróbio houve a formação de Ag_2S a partir de 60% da NPAg adicionada ao reator, reduzindo a inibição causada pela prata, notaram também que uma parte da NP aderiu ao lodo. Yuan e colaboradores (2015) verificaram a influência da exposição a longo prazo de NPAg, em um reator de membranas, com zonas anaeróbias e aeróbias. Verificaram que concentrações de 5 mg NPAg.L^{-1} foram suficientes para impactar a remoção de DQO, bem como a remoção de fósforo, reduzindo 10% e 16% na eficiência de remoção de DQO e P, respectivamente. Além disso, houve uma mudança na comunidade bacteriana ao longo do tempo. Os autores detectaram a mudança da estrutura de floco do lado ativado, reduzindo o seu tamanho.

A NPAg também pode ser prejudicial para peixes, plantas e ao homem. Foram encontrados embriões e espécies adultas de peixes com má formação (MUTH-KOHNE et al., 2013; WU et al., 2010) quando expostos a aproximadamente 1 mgNPAg.L^{-1} . Plantas comestíveis (abobrinha e alfafa) tiveram seu desenvolvimento prejudicado e apresentaram acúmulo de prata, que ao serem consumidos pelo homem e por animais, podem gerar malefícios à saúde (STAMPOULIS et al., 2009; BALI et al., 2010). Devido ao seu tamanho nanométrico, podem entrar no corpo humano por via respiratória, digestiva ou por contato na pele, sendo que em todos esses casos, chegam à corrente sanguínea,

espalhando a NPAg por todo organismo (TAKENAKA et al. 2001). A nanopartícula apresenta risco para crianças que entram em contato com brinquedos, roupas e mamadeiras contendo NPAg, podendo ingeri-las. Estudos já detectaram nanopartículas de prata na urina, suor e saliva dessas crianças (QUADROS et al., 2013). Em outros casos, pacientes que foram tratados com curativos específicos para tratar queimaduras com NPAg, desenvolveram sintomas de hepatotoxicidade e de argiria (doença relativa ao acúmulo de prata no organismo), apresentando sintomas como alterações na função do fígado e na coloração da pele (KIM et al., 2008).

Por conseguinte, o acúmulo de prata no organismo pode gerar problemas de saúde, com isso se faz necessário utilizar a prata com parcimônia, seja em medicamentos ou em outros bens de consumo. É importante também tomar cuidado no manuseio e produção das mesmas, evitando que NP se dispersem no ar, água e solo, fazendo com que NPAg possa ser utilizada com suas propriedades benéficas, sem riscos para o ambiente e à saúde.

3.2 CICLO BIOQUÍMICO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é essencial para a vida, fazendo parte da constituição de proteínas e ácidos nucleicos em seres vivos (BITTON, 2005). Está em diferentes reservas em variadas formas de N na atmosfera, oceanos, solos, e na biota. Na natureza ele se encontra nos mais diversos estados de oxidação, sendo que sua valência varia entre -3 (NH_4^+) e +5 (NO_3^-) e as reações que levam a oxidação ou redução do nitrogênio do ciclo são realizadas principalmente por microrganismos. A Figura 2 representa a complexidade desse ciclo, com todas suas transformações.

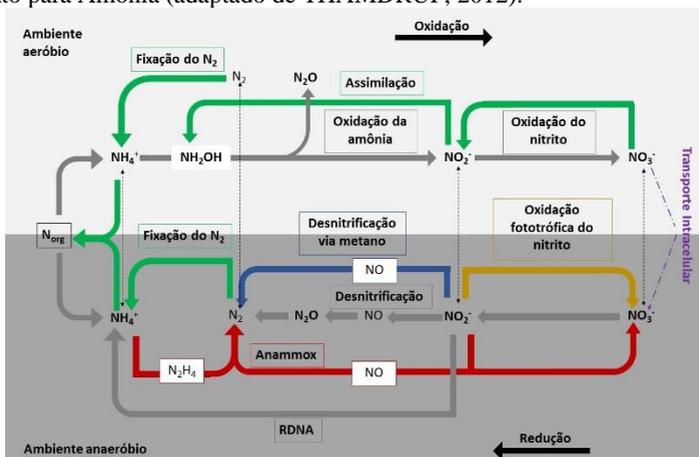
Esse ciclo tem sido alterado pela ação do homem. A agricultura, por exemplo, insere fertilizantes que nitrogênio (entre outros compostos) no ambiente de maneira desequilibrada, além disso, vastas plantações de leguminosas também contribuem para a fixação do nitrogênio em maior escala do que em ambientes naturais (CANFIELD et al., 2010). Não pode ser esquecida a combustão de combustíveis fósseis que também injetam gases nitrogenados na atmosfera, desequilibrando esse ciclo.

O processo assimilativo, indicado pelas setas em verde da Figura 2 é relacionado com a aquisição de biomassa, envolve fungos, plantas, algas e bactérias. Já o processo dissimilativo (setas em cinza) envolve a geração de energia, quando o nitrato ou nitrito são utilizados como aceptores de elétrons na cadeia respiratória (THAMDRUP, 2012). Os

processos de fixação, desnitrificação e nitrificação (oxidação da amônia e do nitrito) já estão bem descritos na literatura (MADINGAN et al., 1997; ATLAS e BARTHA, 2002). Entretanto algumas descobertas em relação a esses processos foram observadas em pesquisas mais recentes.

Na reação anammox (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) a amônia é oxidada, tendo o nitrito como acceptor de elétrons, formando nitrogênio gasoso. Foi observada experimentalmente pela primeira vez por Mulder e colaboradores (1995). É uma reação autotrófica, que utiliza carbono inorgânico, em condições de limitação de oxigênio, para que ocorra a remoção de nitrogênio (VAN HULLE et al., 2010). Entretanto é um processo muito sensível, deve ser muito bem controlado para que ocorra com boa eficiência.

Figura 2 Esquema representativo do ciclo do Nitrogênio. Processo de assimilação está em verde, dissimilatório em cinza. As demais cores representam processos relatados recentemente. As flechas pontilhadas indicam trocas entre o meio aeróbio e anaeróbio. RDNA – Redução Dissimilatória do Nitrato para Amônia (adaptado de THAMDRUP, 2012).



Outra etapa que não é normalmente vista nos ciclos de N, é a desnitrificação via metano. Que é a oxidação do metano via redução do nitrito, formando N_2 . Foi observado pela primeira vez em um biorreator por Isla-Lima e colaboradores (2004), sendo caracterizado posteriormente por Ettwig e colaboradores (2009 e 2010). A bactéria responsável por esta etapa ainda não foi isolada. O processo RDNA (redução dissimilatória do nitrato para amônia) é realizado com a oxidação de carbono orgânico, em ambiente anóxico, podendo ser um

processo fermentativo que pode ser realizado por fungos (THAMDRUP, 2012).

Dentre todas essas etapas, a nitrificação e a desnitrificação são as mais encontradas nos sistemas de tratamento de efluentes que visam a remoção de nitrogênio. Nesses processos o nitrogênio amoniacal é convertido a nitrito e a nitrato pelas bactérias oxidadoras de amônia, tendo o oxigênio como aceptor de elétrons (nitrificação), em seguida, a desnitrificação, onde o nitrato é transformado em nitrogênio gasoso, sendo reduzido por matéria orgânica ou outros compostos doadores de elétrons, como tiosulfato e sulfetos. Em ambos processos é possível produzir N_2O , um gás de efeito estufa. No caso da nitrificação essa produção é reportada, é chamada de “desnitrificação nitrificante” onde, em determinadas condições de concentração de oxigênio, alta salinidade, por exemplo, esse gás é produzido (CHANDRAN et al., 2012; ZHAO et al., 2014).

A etapa de nitrificação é conhecida por ser a parte mais sensível deste processo, sendo a etapa limitante na remoção de nitrogênio. Um dos motivos é o seu crescimento lento (processo autotrófico) e, também, a sua susceptibilidade às variações nas condições ambientais. Pequenas alterações na composição do meio, no pH, na temperatura ou a presença de compostos tóxicos pode afetar na eficiência dessa etapa (BERNET e SPÉRANDIO, 2009). Atualmente, vem aumentando a preocupação com a presença de micropoluentes, como hormônios, antibióticos e mais recentemente, nanopartículas. Alguns estudos já mostraram que essa etapa é afetada pela presença de nanopartículas de prata, ao contrário da desnitrificação que praticamente não sofre alterações na presença deste tóxico (LIANG et al., 2010). Tendo em vista o escopo desse trabalho, será explanado aqui apenas esta etapa transformação do íon amônio a nitrito e a nitrato, ou seja, a nitrificação.

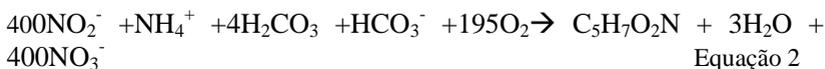
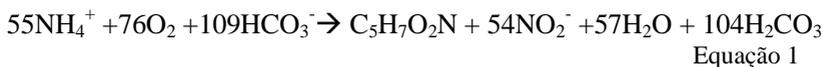
3.2.1 Nitrificação

A oxidação da amônia e do nitrito, que compõe as etapas da nitrificação, pertencente ao ciclo do nitrogênio (Figura 2), ocorre em ambientes naturais, realizado por bactérias presentes no solo, águas marinhas e continentais (BERNET e SPÉRANDIO). Caso essa etapa seja inibida pela presença de compostos tóxicos haverá acúmulo de amônia ou nitrito no solo, desequilibrando todo o ciclo.

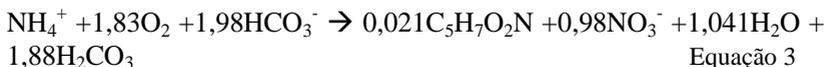
A nitrificação é um processo estritamente aeróbio, realizado por bactérias quimiolitotróficas, de crescimento lento. Possui duas etapas, a primeira é realizada por bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e a

seguinte por bactérias oxidadoras de nitrito (BON) (BERNET e SPÉRANDIO, 2009). A nitrificação, oxidação da amônia até nitrito (Equação 1), é realizada por beta ou gama proteobactérias como *Nitrosomonas*, *Nitrospira* e *Nitrosococcus*. Dependendo do tipo de tratamento de efluentes, uma ou outra espécie pode predominar (SCHMIDT et al., 2003). A oxidação do nitrito até nitrato é realizada por outro grupo de bactérias, alfa proteobactérias, como a *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* e *Nitrocystis* (RITTMANN E MCCARTY, 2001). O uso de técnicas de biologia molecular demonstrou que em tratamento de efluentes o gênero *Nitrospira* predomina (DAIMS et al., 2000).

As reações a seguir demonstram a reação de nitrificação (Equação 1) e de nitratação (Equação 2), incluindo o anabolismo. A Equação 3 mostra a equação global da nitrificação (HENZE et al., 1997).



Equação global



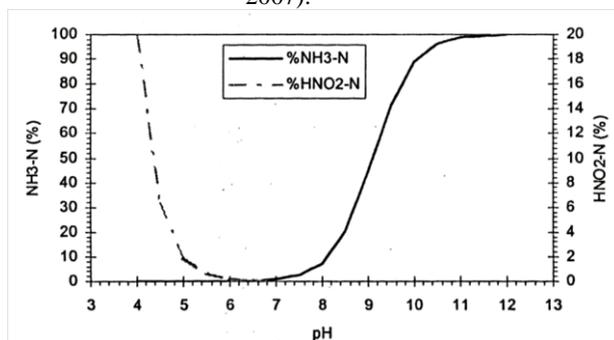
Como é observado nas reações, esse é um processo em que ocorre o consumo de alcalinidade (neste caso, representado por bicarbonato), sendo necessário, 11,88 mgNaHCO₃/mgN-NH₄⁺ na etapa representada pela Equação 1. É um processo com baixo crescimento celular, gerando apenas 0,145 mg de C₅H₇O₂N a cada mg de N amoniacal oxidado na nitrificação e 0,020 mg de célula é formada na segunda etapa, nitratação. O consumo de oxigênio na oxidação da amônia é de 3,158 mgO₂.(mgN-NH₄⁺)⁻¹, e na oxidação do nitrito é de 1,114 mgO₂.(mgN-NO₂⁻)⁻¹.

Algumas condições ambientais podem afetar a atividade dessas bactérias, a seguir serão discutidas algumas delas. O pH ideal para a nitrificação está entre o neutro e o levemente alcalino, na faixa de 7,5 a 8,0 (GIESEKE et al., 2006). Variações de pH podem alterar o equilíbrio químico do meio. Os equilíbrios mais importantes são dos substratos, das BOA (NH₄⁺/NH₃) e das BON (NO₂⁻/HNO₂). Sabe-se que os

verdadeiros substratos desses grupos bacterianos são amônia livre (NH_3) e ácido nitroso, respectivamente. Porém, esses mesmos compostos, em altas concentrações podem ser inibitórios (BERNET e SPÉRANDIO, 2009). A Figura 3 mostra este equilíbrio. Entre pHs 7 e 8 a concentração de ácido nitroso é praticamente nula; já para pHs abaixo de 6 a concentração de HNO_2 aumenta, podendo causar inibição no sistema nitrificante (SCHMIDELL e REGINATTO, 2007). Para o equilíbrio $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, em pH neutro ou ácido encontra-se a forma ionizada, e à medida que o pH fica mais básico a concentração de amônia livre aumenta. A atividade das bactérias nitrificantes é inibida entre 10 e 150 $\text{mg NH}_3\text{L}^{-1}$ e para as nitrificantes esse valor é bem menor, entre 0,1 e 1 $\text{mg NH}_3\text{L}^{-1}$, indicando que as oxidadoras de nitrito apresentam maior inibição que as oxidadoras de amônio (SCHMIDELL e REGINATTO, 2007).

Outro fator que impacta o crescimento tanto das BOA quanto das BON é a temperatura. Bactérias nitrificantes são mesofílicas, tendo como temperatura ótima a faixa entre 28 e 36°C (BERNET e SPÉRANDIO, 2009). Portanto, é possível fazer uma seleção das bactérias oxidadoras de amônia, controlando a temperatura e o tempo de retenção celular. Em temperaturas variando entre 30 e 35°C é possível fazer o “wash-out” de BON, acumulando nitrito no reator, desde que isso seja combinado com limitação do oxigênio dissolvido (HELLINGA et al., 1998; BOUGARD et al., 2006).

Figura 3 Porcentagem de amônia livre e ácido nitroso como N, em relação a concentração de íon amônio e nitrito presente (SCHMIDELL e REGINATTO, 2007).



A concentração de oxigênio dissolvido também influencia a atividade das bactérias oxidadoras de amônia. Sendo que BOA e BON tem constantes de afinidade ao oxigênio diferentes entre si. As primeiras possuem um valor menor, ou seja, possuem maior afinidade ao

oxigênio, o segundo grupo possui um valor maior, portanto, com menor afinidade pelo substrato. Canziani e colaboradores (2006) sugeriram um k_o (constante de saturação para o oxigênio) de $0,3 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ para as BOA e $1,1 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ para as BON. Isso também auxilia a selecionar as bactérias nitrificantes, quando desejado. Ao limitar o sistema em oxigênio as BON sofreram maior impacto que as BOA, crescendo mais lentamente, dando condições para que o meio seja enriquecido em BOA.

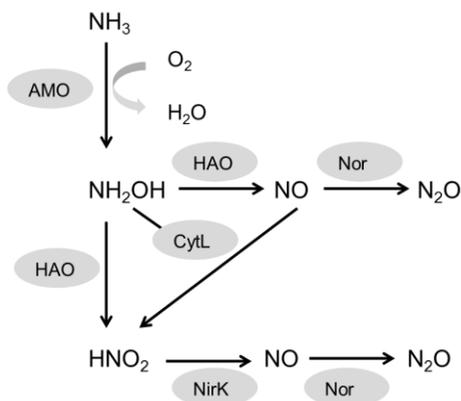
Com a prática da nitrificação parcial, ou seja, a oxidação da amônia apenas até nitrito, a quantidade de oxigênio necessária para ser transferida para ao meio é reduzida. Para evitar a oxidação do nitrito, a temperatura é mantida em aproximadamente 35°C e o pH também fica elevado (8,0-8,2). Deste modo, ocorre o *wash-out* das bactérias oxidadoras de nitrito (HELLINGA et al., 1998). Sendo que as linhagens de *Nitrosomonas* predominam no reator após a seleção das bactérias nitrificantes, ou seja, após o *wash-out* (LOGEMANN et al., 1998). Nesse caso, além do controle de temperatura e pH, limita-se a transferência de oxigênio através de períodos aerados, intercalados por períodos sem aeração, reduzindo assim a disponibilidade de O_2 , favorecendo as bactérias nitrificantes (ZDRADEK 2005; FERRETI, 2009; BRESSAN, 2012).

As BOA são bem conhecidas fisiologicamente e geneticamente, tornando-as convenientes para estudar o efeito desses compostos tóxicos. As bactérias nitrificantes, especialmente as oxidadoras de amônia, também são utilizadas como indicadores de compostos tóxicos, atuando como biossensores, pois são sensíveis a presença dessas substâncias, mesmo em baixas concentrações. Podem ser feitos testes com bactérias isoladas (WOOD et al., 1981; GRUNDITZ e DALHAMMAR, 2001; WANG e GUNSCH, 2011) ou então nitrificantes presentes em lodos ativados (CARUCCI et al., 2006).

A Figura 4 mostra um fluxograma das etapas de nitrificação, evidenciando os compostos intermediários e genes responsáveis por cada etapa. As bactérias quimiolitotróficas oxidadoras de amônia, formam nitrito, através da oxidação de NH_4^+ , via hidroxilamina (NH_2OH). Na primeira etapa ocorre a formação de NH_2OH através da redução de O_2 , por meio da ação da enzima amônia monooxigenase (AMO). Na segunda etapa, a reação é catalisada pela hidroxilamina oxidoreductase (HAO), ocorrendo a oxidação da hidroxilamina para nitrito. A nitrificação também é um processo capaz de produzir o óxido nítrico, gás de efeito estufa (Figura 2). O óxido nítrico (N_2O), pode ser formado por duas rotas metabólicas: uma delas é através da oxidação incompleta de NH_2OH para NO_2^- , onde a formação do N_2O é catalisada

pela ação da hidroxilamina oxidoredutase (HAO), tendo o NO como intermediário, também pela ação da enzima ou pela decomposição química da hidroxilamina. O outro caminho é a redução do nitrito a óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N₂O) (CHANDRAN et al., 2012; ZHAO et al., 2014). A produção do N₂O é vinculada a ação dos genes *nirK* e *norCBQD* que codificam a nitrito redutase e a óxido nítrico redutase, respectivamente (CHAIN et al., 2003).

Figura 4 Etapas da reação de nitrificação e seus caminhos metabólicos (adaptado de CHANDRAN et al., 2011)



O conhecimento do caminho metabólico da nitrificação, e das enzimas envolvidas em cada etapa, é relevante para a abordagem da expressão dos genes presentes nesse processo. Assim, é possível relacionar os caminhos metabólicos utilizados pelas BOA em situações adversas.

3.3 MECANISMOS DE INIBIÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE PRATA

O mecanismo causador da inibição pela NPAg ainda não está bem estabelecido na literatura. Pode se dar tanto por íons de prata, quanto por nanopartículas e essa diferença entre as inibições tem sido discutida amplamente e, mesmo com os diversos estudos, ainda existem questões controversas em relação a isso.

Existem diversos mecanismos de ação relacionado apenas à nanopartícula de prata, dependendo de fatores como tamanho, recobrimento e forma da NPAg. Elas também podem formar

aglomerados, afetando a capacidade de inibir a atividade microbiana por este composto. Este processo faz com que as nanopartículas se tornem maiores e assim liberem menos íons, influenciando o grau de inibição gerado por elas. Logo, para evitar esse processo, utilizam-se revestimentos para aumentar a estabilidade da nanopartícula (YANG et al., 2013b).

Um dos mecanismos é relacionado ao tamanho de NPAg, que pode aderir a membrana celular, mudando a permeabilidade desta ou atravessando a membrana, danificando demais sistemas bacterianos.

Morones e colaboradores (2005) verificaram que as NPAg com tamanho variando 21 ± 18 nm aderiram à bactéria devido a sua interação com compostos que contêm enxofre presentes nas proteínas da membrana celular, afetando a permeabilidade da mesma, prejudicando as trocas e a respiração. Khan e colaboradores (2011) investigaram a influência da salinidade e do pH do meio na interação da NPAg com as proteínas extracelulares da bactéria. Em pH levemente básicos (no máximo 8) as nanopartículas possuem potencial zeta positivo e as proteínas extracelulares possuem carga negativa, havendo uma atração entre as duas partes, fazendo com que elas interajam entre si. Já a salinidade acima de 0,1 M de NaCl acarreta a repulsão entre as NPAg e a bactéria, já que ocorre a modificação da carga superficial da NP. Wigginton e colaboradores (2010) verificaram que as NPAg são capazes de se ligar a proteína, reduzindo a atividade enzimática.

Uma vez presente na superfície da bactéria, a nanopartícula pode tanto entrar na bactéria através dos poros presentes na sua superfície ou sofrer endocitose e ser incorporada na bactéria (MORONES et al., 2005; KIM et al., 2008; McSHAN et al., 2014). Em ambos casos, foi demonstrado que a prata interage com compostos que contêm enxofre e fósforo, como o DNA, podendo danificá-lo e impedindo que a bactéria de reproduza de forma apropriada, podendo inclusive gerar a morte bacteriana. Partículas menores (<10 nm) podem passar pela membrana celular e inibir o crescimento celular. Choi e Hu (2008) detectaram que partículas com 5 nm são capazes de passar pelos poros da membrana, causando danos aos constituintes celulares e ao metabolismo. Há relatos também da internalização de NPAg por nematoides, gerando incapacidade de expelir os ovos, fazendo com que eles eclodam internamente (MEYER et al., 2010).

As nanopartículas de prata são capazes de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, que faz com que seja estimulado o mecanismo antioxidante celular, que pode danificar o DNA, induzindo a morte celular sem danos à membrana (KIM et al., 2007). Também pode

danificar as trocas que ocorrem na mitocôndria (STENSBERG et al., 2011), gerando acúmulo intracelular de radicais livres e dissipação da força motriz dos prótons para a geração de ATP. Deste modo, nota-se em geral, que ainda há muita dúvida quanto à forma de ação da nanopartícula, havendo vários mecanismos propostos. Porém, o que parece mais aceito são os estudos que apontam para a produção de espécies reativas de oxigênio.

Além de todos esses mecanismos propostos, a inibição gerada pela NPAg ainda pode estar relacionada a dissolução de íons de prata a partir das nanopartículas. Choi e colaboradores (2008), por exemplo, testaram a mesma concentração de nanopartículas de prata e de íons de prata (1 mgAgL^{-1}) e encontrou inibição de aproximadamente 41% e 13% na nitrificação, respectivamente; indicando que as NPAg são mais tóxicas que os íons, para uma biomassa proveniente de lodo ativado. No entanto, isso não pode ser tomado como verdade absoluta devido aos diversos outros estudos que apontam na direção oposta. Beer e colaboradores (2012) verificaram que o efeito tóxico da nanopartícula ou do íon de prata está relacionada com a concentração destes em solução. Ou seja, quando a concentração dos íons é baixa, NPAg ainda apresentará contribuição na inibição, porém, quando a fração de íons for maior (>5,5%) a contribuição das nanopartículas na inibição microbiana é reduzida.

Outros autores apontam que a dissolução oxidativa das nanopartículas na água está diretamente ligada à sua capacidade de gerar inibição. Na presença de oxigênio as NPAg são oxidadas, liberando Ag^+ , podendo gerar espécies reativas de oxigênio atuando como agentes antimicrobianos, destruindo ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, lipídios, causando a morte celular. Xiu, e colaboradores (2012) mostraram que a presença de oxigênio faz com que íons de prata sejam liberados das nanopartículas, o que não acontece em anaerobiose. Este autor expôs a bactéria *Escherichia coli* a diferentes concentrações de NPAg, em aerobiose e em anaerobiose. Observou que apenas em aerobiose, houve redução da atividade dessas bactérias. Também detectou a presença de íons de prata nesses casos (aerados), indicando que na verdade, a inibição se deve a liberação de íons de prata, e não da nanopartícula em si.

Os íons de prata podem interagir com grupos tiol de enzimas e de bases contendo fósforo, deste modo, quando NPAGs quando presentes no espaço intracelular é possível que a interação da prata com DNA impeça ou prejudique a sua divisão, causando a morte celular (FENG et al., 2000; WIJNHOFEN et al., 2009). Holt e Bard (2005) verificaram

que a presença de íons de prata, numa cultura de *Escherichia coli* prejudica a cadeia respiratória. Para concentrações baixas do íon ($< 10\mu\text{M}$) ocorre um aumento da respiração, pois Ag^+ gera um colapso do gradiente de prótons (a membrana citoplasmática se torna permeável aos prótons, pois a prata interage com proteínas ligadas à membrana). Para tentar compensar, a célula respira mais rápido, na tentativa de produzir o gradiente. Entretanto, isso não ocorre, levando a morte celular. Outra maneira gerar inibição pelos íons de prata é pela atração desse pela carga negativa da parede celular bacteriana, gerando espécies reativas de oxigênio que levam a lise celular (MATSUMURA et al., 2003; CHOI et al., 2008).

Portanto, o mecanismo que gera inibição ainda é questionável, havendo vários fatores a serem verificados como tamanho da nanopartícula, revestimento, tempo de exposição, concentração dos íons de prata, tanto sozinhos como na suspensão de NP_{Ag}, entre outros, que podem afetar a forma com que a prata age sobre os seres vivos.

3.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA E SUAS IMPLICAÇÕES NA NITRIFICAÇÃO

Apesar das nanopartículas serem importantes para o desenvolvimento de novos materiais e, mesmo utilizando uma quantidade mínima de matéria-prima, podem impactar de forma negativa o metabolismo animal, vegetal e microbiano. Entretanto, pouca pesquisa tem sido feita em comunidades bacterianas naturais, presentes nos ciclos biogeoquímicos (ciclo do carbono e nitrogênio, por exemplo). A redução da atividade dessas bactérias pode levar ao desequilíbrio desses elementos (FABREGA et al., 2011).

Algumas bactérias que compõem o grupo de organismos participantes de processos de degradação biológica do efluente, estão sujeitas a presença de nanopartículas de prata que são lixiviadas dos inúmeros produtos que as contém. Isso pode influenciar a atividade das bactérias nitrificantes, pertencentes ao ciclo do nitrogênio. No entanto, as informações sobre isso são contraditórias. Alguns autores encontram inibição elevada e outros, baixa. Choi e colaboradores. (2008) cultivaram em um reator com agitação bactérias nitrificantes (oxidadoras de amônia) que foram expostas a NP_{Ag}, íons de Ag^+ e coloides de AgCl , todos com concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A biomassa apresentou inibição da atividade respiratória em $86\pm 3\%$, $42\pm 7\%$ e $46\pm 4\%$, respectivamente, ou seja, a inibição mais relevante foi para as

NPAg. Já Xiu e colaboradores (2012) afirmam que a atividade antimicrobiana das NPAg é mínima quando comparada aos íons.

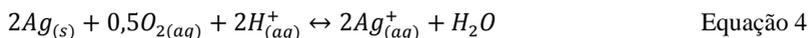
Fabrega e colaboradores (2011) ressaltaram que é pouco conhecido o mecanismo que gera toxicidade das NPAg, sabendo-se apenas que são partículas tão pequenas que podem gerar bioacumulação com maior relevância que o cátion Ag^+ .

O tamanho das nanopartículas também se mostrou importante para o efeito tóxico Radniecki e colaboradores (2011) verificaram que partículas menores de prata (20 nm) são mais tóxicas que partículas maiores (80 nm) em uma cultura pura de *Nitrosomonas europaea*. Observaram também que a inibição se deve a liberação de prata dissolvida das nanopartículas.

Yuan e colaboradores (2013) verificaram a inibição da NPAg sobre bactérias nitrificantes (cultura pura *Nitrosomonas europaea*) em diferentes suspensões com partículas. Duas delas continham partículas com 7 nm de diâmetro e uma terceira com partículas de 40 nm, revestidas de adenosina trifosfato dissódico (Na_2SO_4 -ATP), álcool polivinílico (PVA) e Na_2ATP , respectivamente. Além de observarem que as nanopartículas causam danos à parede celular bacteriana, demonstraram também que as partículas com menor tamanho e revestidas com ATP apresentaram maior dissociação da prata, já a partícula maior, com 40 nm, foi a que menos liberou íons prata. Os autores argumentaram que o ocorrido deveu-se a diferença no revestimento da nanopartícula e que partículas menores tem área superficial maior. Porém, a partícula com PVA7, com menor tamanho e menor liberação de prata gerou maior inibição, indicando que o dano foi causado pelas nanopartículas e não pelo íon de prata. Além disso, a formação de proteínas essenciais foi inibida pela prata.

Liu e Hurt (2010) utilizaram NPAg estabilizadas com citrato. E os autores verificaram que dissolução de prata das nanopartículas aumenta ao longo do tempo, na presença de oxigênio. Em anaerobiose isso não ocorre, sugerindo que é necessário o oxigênio para iniciar a liberação da prata. Demonstraram também que a dissociação da prata é altamente dependente do pH. Em pH mais ácidos (menores que 6, em ambientes com oxigênio) a dissolução é acentuada; porém, em pH superior a 7,4 a concentração de prata dissolvida cai. Isso indica que a dissolução da prata é dependente tanto da presença de oxigênio como da presença de prótons. Eles também relatam que íons de prata podem adsorver sobre a superfície da nanopartícula de prata, reduzindo a sua presença na solução. Os mesmos autores também indicam a reação que coordena a liberação de íons de prata (Equação 4), onde o $\Delta G_{rxn}^0 = -$

91,4kJmol⁻¹ a 25°C. A temperatura também pode influenciar; quanto mais elevada (37°C), maior a dissolução.



Alguns estudos já reportaram que NPAg em sistemas de lodos ativados gera redução da eficiência do processo. Liang e colaboradores (2010) verificaram como cargas elevadas de nanopartículas de prata – NPAg (choques de carga) influenciam um sistema de lodos ativados, observando que a concentração de 0,75 mgAg.L⁻¹ gerou acúmulo transiente de nitrito e amônia no reator, indicando que a prata foi tóxica para as bactérias nitrificantes (autotróficas) desse sistema. O mesmo não foi observado para as bactérias heterotróficas, que não sofreram redução de atividade. Yang e colaboradores (2012a) concluíram que concentrações de até 40 mg.L⁻¹ de NPAg não influenciam a digestão anaeróbia e a metanogênese. Os autores ainda observaram que após um pulso de NPAg houve um decréscimo tanto dos gêneros *Nitrosomonas* (BOA), *Nitrospira* e *Nitrobacter*, sendo o último não mais detectado no reator, mostrando assim a sensibilidade desses grupos a presença da NPAg. Entretanto, Zhang e colaboradores (2014), expondo um biorreator com membranas, não enriquecido em bactérias nitrificantes à doses sub letais de NPAg (< 0,10 mgNPAg.L⁻¹), não observaram diferença na estrutura da comunidade bacteriana nitrificante. Fato que indicou que concentrações muito baixas de nanopartícula de prata, não influenciam de maneira significativa a remoção de nitrogênio desses sistemas, devido à alta complexidade do meio e também a elevada concentração de sólidos suspensos voláteis.

No estudo realizado por Choi e colaboradores (2008), os autores avaliaram os efeitos de choque de carga em um reator Ludzack-Ettinger modificado e observaram que íons de prata permaneciam no efluente do sistema por 20 dias após o choque. Para as bactérias heterotróficas não houve diferença da remoção de carbono. Já para as bactérias nitrificantes houve um pequeno acúmulo de amônia, que desapareceu após 14 dias. Porém, os autores não monitoraram nitrito ou nitrato, desta forma, o nitrogênio pode ter acumulado no reator. Através de testes respirométricos, observaram que a atividade das bactérias nitrificantes caiu 46% em 14 dias após o choque e seguiu baixa mesmo 25 dias após o choque

Yang e colaboradores (2013a) apontaram que a concentração mínima letal (CML) de nanopartículas de prata e de íon de prata para a bactéria autotrófica *Nitrosomonas europaea* é menor, ou seja é mais

tóxico, do que para demais bactérias heterotróficas do ciclo do nitrogênio. Observaram que a aglomeração das nanopartículas foi menor no meio nutritivo para as bactérias nitrificantes do que para as demais bactérias estudadas. Isto pode ser devido à baixa concentração de matéria orgânica no meio, apesar de possuir alta força iônica, o que contribui para a aglomeração. Constataram também que em concentrações baixas (10% da CML) aumentam a expressão dos genes *amoA1* e *amoC2*, indicando efeito que estimula o metabolismo, em consequência do aumento das taxas de respiração para obter mais energia para reparar o dano. Os íons de prata liberados para o meio se ligaram à amônia livre, formando $\text{Ag}(\text{NH}_3)_3$ e AgNH_3 , em torno de 18% da prata adicionada foi encontrada dissolvida no meio.

Apesar de alguns trabalhos citarem expressão gênica relativa em culturas puras, ela ainda é escassa na literatura. Esse método de biologia molecular nos permite compreender melhor os resultados analíticos obtidos. Possibilita discutir com maior confiabilidade as rotas metabólicas que estão sendo utilizadas pelos microrganismos, e por que estão ocorrendo.

Outro item a ser estudado é a possibilidade de formação de gases de efeito estufa devido à presença de NP_{Ag}. A nanopartícula de prata reduz a atividade das bactérias, como foi apontado pelos estudos aqui citados, gerando acúmulo de amônia ou nitrito no meio. Além disso, as bactérias nitrificantes, que oxidam a amônia a nitrito, podem gerar, durante essa transformação, outros compostos (Vide Figura 4, página 43). Entre eles estão o NO e N₂O, conhecidos por serem gases do efeito estufa. Dados apontam que as plantas de tratamento de efluentes são capazes de emitir quantidades de N₂O equivalente a emissão de CO₂ gerada por 900.000 carros (USEPA), porém, os valores estimados pelo IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) são menores do que os reais, muitas vezes em 2 ordens de magnitude (CHANDRAN et al., 2011).

Observou-se nos estudos presentes até então que praticamente não há monitoramento dos produtos da nitrificação em ensaios cinéticos, não sendo possível efetuar os balanços do nitrogênio, verificando se há ou não perda deste elemento na forma de gases. Também não foram encontrados dados da dose letal média para culturas enriquecidas em bactérias oxidadoras de amônia. Logo, não há um monitoramento completo do sistema, não sendo possível compreender como a NP_{Ag} impacta integralmente esses sistemas. Algumas metodologias de biologia molecular, como a análise da expressão gênica envolvida neste efeito tóxico utilizando as bactérias nitrificantes como modelo, integrada

ao monitoramento das cinéticas, tornará possível se ter a visão “global” do problema.

3.5 USO DE MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

O uso de biologia molecular em pesquisas na área ambiental já está bem estabelecido (GILBRIDE et al., 2006; DAIMS et al., 2006; SANZ e KOCHLING, 2007). Tais métodos podem fornecer informações morfológicas, metabólicas, bioquímicas e genéticas tanto em ambientes naturais como em sistemas feitos pelo homem, como sistemas de tratamento de efluentes.

Como exemplo podemos citar o FISH e o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A técnica, FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*), envolve a utilização de sondas com fluoróforos específicos que tem como alvo RNA ribossomal, sendo normalmente utilizada para verificar se membros de uma determinada afiliação filogenética podem ou não estar presentes no ambiente estudado. As células devem ser fixadas para tornar a bactéria permeável à sonda, que é hibridizada com as sondas de ácidos nucleicos, em uma lâmina de vidro. As sondas podem conter fluoróforos ou então ele pode ser adicionado em uma etapa adicional. As células são visualizadas em microscópio de epifluorescência ou microscopia confocal. A sonda mais utilizada é a EUB338 que tem como alvo eubactérias (GILBRIDE et al., 2006; DORIGO et al., 2005; BOUVIER e DEL GIORGIO, 2003).

Sanz e Kochling (2007) apontaram como vantagens do método: permitir a visualização e localização de microrganismos não cultivados; geralmente quantitativo, possibilidade de determinar grupos específicos, não necessita de experiência profunda em laboratório e em microscopia para fazer análise. Entre as principais desvantagens apontaram que: o desenho de uma nova sonda é difícil e os resultados nem sempre são satisfatórios; a quantificação pode ser subjetiva (contagem manual) ou complexa (análise de imagens); não fornece um entendimento das funções metabólicas dos microrganismos; baixa intensidade de sinal; a análise estrutural de flocos exige um microscópio confocal. Devido a estas desvantagens foram desenvolvidas algumas melhorias, visando aumentar a intensidade do sinal (ZWIRGLMAIER, 2005) ou combinando esta técnica com outras técnicas como autorradiografia, electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (WAGNER et al., 2003; WANGNER et al., 2006; CHANG et al., 2012).

Bouvier e del Giorgio (2003) compararam os trabalhos até então realizados utilizando a sonda EUB388 em sistemas aquáticos, em

diversas amostras ambientais. A proporção de células hibridizadas com a sonda estudada varia e, raramente, é igual a contagem feita com outros métodos, revelando que 56% das células presentes no meio são detectadas com essa sonda. A diferença foi atribuída a fatores metodológicos e condições ambientais, apontando a necessidade de adaptar o método conforme a aplicação que se faz do FISH. Bressan (2012), utilizando as sondas Nso190 e NIT3 para detectar dois grupos, bactérias oxidadoras de amônia e oxidadoras de nitrito (Gênero *Nitrobacter*). E conseguiu determinar que as primeiras eram mais abundantes em um sistema enriquecido em bactérias nitrificantes. Essa detecção é feita por observação das imagens geradas por microscópio, que permite também compreender como as bactérias estão distribuídas espacialmente em floco.

Outras técnicas de biologia molecular utilizadas para caracterizar amostras de culturas cultivadas ou provenientes de ambientes naturais, envolvem a amplificação do DNA. Para isso é utilizada a técnica de PCR, onde ocorre a ampliação exponencial de uma região selecionada do DNA, utilizando um par de primers, também chamados de iniciadores (oligonucleotídeos) que são complementares a cada fita de DNA. Essa reação catalisada por uma DNA-polimerase purificada. A reação ocorre sucessivamente, havendo uma ampliação exponencial daquela sequência alvo do DNA. Após alguns ciclos o produto presente em maior quantidade é uma espécie única de fragmento de DNA, com comprimento igual à distância entre dois iniciadores originais. Para amplificar o DNA é utilizado um termociclador, onde são aplicadas etapas com diferentes temperaturas para desnaturar, anelar e sintetizar o DNA (HUNT, M. 2010; ALBERTS et al., 2010).

Outra técnica é o DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante), onde fragmentos de DNA do mesmo tamanho, porém, com diferentes sequências de ácidos nucleicos geram padrões de bandas que, quando corridos em um gel específico, mostram a diversidade genética da amostra. É utilizada quando se faz necessário conhecer os membros predominantes de uma comunidade microbiana, com média resolução filogenética (SANZ e KOCHLING, 2007). Esta técnica é adequada para um vasto número de microrganismos, todavia dependendo da amostra, a extração e amplificação do DNA podem ser difíceis e a intensidade das bandas pode variar (GILBRIDE et al., 2006) Logemann e colaboradores (1998) utilizaram esta técnica para analisar a comunidade de bactérias nitrificantes em um reator do tipo SHARON (*Single Reactor System for High Activity Ammonia Removal Over Nitrite*). Os autores verificaram que duas espécies de BOA *N. europaea*

e *N. eutropha* possuem 98,4% de semelhança com o gene 16S rRNA, não sendo possível distinguir qual das duas espécies predominam por outros métodos de biologia molecular. Porém, utilizando o DGGE, verificaram diferentes migrações dos produtos de PCR no gel, sendo possível analisar filogeneticamente a amostra. Determinaram também que a bactéria *N. eutropha* predominava no reator. Os resultados foram comparados aos obtidos com a técnica de FISH, confirmado que 50-70% das bactérias presentes no reator pertenciam ao gênero *Nitrosomonas*. Indicando que as duas técnicas podem ser suplementares.

O PCR também pode ser quantitativo (reação em cadeia da polimerase em tempo real), indicado pela sigla qPCR. Ele é realizado com os primers, assim como no PCR convencional, porém é adicionado um fluoróforo. A quantificação é realizada através de detecção da fluorescência produzida durante a fase inicial da amplificação exponencial do DNA, sendo essa fluorescência diretamente relacionada com o produto no final de cada ciclo do termociclador (HEID et al., 1996; GILBRIDE et al., 2006). Os marcadores mais utilizados em estudos microbianos na área ambiental são SYBR green e TaqMan (KIM et al., 2013). A técnica de PCR quantitativo é muito utilizada na área ambiental por monitorar a dinâmica da comunidade microbiana e identificar as espécies presentes no meio estudado (HUANG et al., 2010; RONGSAYAMANONT et al., 2014). Sendo umas das técnicas mais precisas para contar o número de cópias dos genes alvos. Entretanto, deve se conhecer bem as suas limitações: a extração do DNA, caso for extraído diferentes quantidades de ácido nucleico, haverá variações na quantificação dos alvos; o desenho do primer, que pode não ser adequado a amostras; o método não diferencia células vivas ou não; primers seletivos a grupos podem conter pequenas diferenças em relação ao alvo e influenciar amplificações. Portanto são erros potenciais que devem sempre ser considerados ao adotar este método (KIM et al., 2013). Os mesmos autores ainda apontam a falta de um método padronizado para o qPCR, tornando difícil a comparação entre diferentes pesquisas.

A qPCR também é uma etapa utilizada quando se pretende estudar a expressão gênica. Porém, antes dela, é necessário realizar a transcriptase reversa, transformando RNA em DNA. Esse método é conhecido como reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR).

Apesar dos demais métodos serem capazes de mostrar padrões gênicos, o RT-qPCR mede a expressão dos genes diretamente do RNAm. O RNA é extraído e purificado, para que não haja resquícios de

DNA na amostra. Após essa etapa ocorre a formação do cDNA (DNA complementar) a partir do RNA mensageiro (RNAm), através de uma enzima DNA polimerase RNA-dependente (LADEIRA et al., 2011). No final dessa etapa quantidades proporcionais de DNA complementar e RNA mensageiro deverão estar presentes, em uma situação ideal. Após a formação do cDNA, é feito o procedimento utilizado no PCR quantitativo.

Após a amplificação do cDNA, é necessário avaliar a expressão dos genes, e isso pode ser feito de forma absoluta ou relativa. A quantificação absoluta utiliza diluições seriadas de concentrações conhecidas para confeccionar uma curva padrão. É utilizada quando se quer conhecer o número exato de cópias formadas. O método relativo leva em consideração quantas vezes um determinado gene aumentou ou reduziu a sua expressão em relação a outro gene endógeno (gene constitutivo), que sempre expressa da mesma maneira, independente das condições aplicadas à cultura estudada (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O conhecimento da expressão de genes específicos de determinados processos, fornece dados para compreender como o metabolismo das bactérias é influenciado por fatores ambientais, ligando a expressão dos genes com a atividade microbiana (YANG, et al., 2013b).

É um dos métodos mais sensíveis para detecção de concentrações baixas de RNAm. Os ensaios são relativamente fáceis, com uso de pequenos volumes. Entretanto, apresentam algumas desvantagens: os primers podem ser inespecíficos para amostras complexas (como de ambientes naturais), uma vez que inibidores presentes em meios complexos podem inibir a reação de PCR (SALEH-LAKH et al., 2005).

Metz e colaboradores (2003) utilizando uma bactéria isolada do solo (*O. anthropi*), relacionaram a maior expressão do gene *DnirK*, com maior produção de N_2O , estando de acordo com os resultados obtidos em ambientes naturais. O RT-qPCR já foi utilizado por Yang e colaboradores (2012b) e por Yang et al. (2013b) para verificar a expressão dos genes envolvidos na oxidação da amônia em cultura pura de *Nitrosomonas europaea* na presença de Quantum dotz e nanopartículas de prata, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram a expressão dos genes *amoA1*, *amoB2*, *amoC2* (codificam a amônia monooxigenase), bem como, o gene *hoa2* (codifica a hidroxilamina oxidoreductase), responsáveis pela formação de hidroxilamina e nitrito, sofrem modificações na sua expressão, quando expostos a estes compostos. E isso pode refletir no metabolismo dessa bactéria. Entretanto, neste caso, foi apenas possível supor a relação com

o metabolismo das mesmas, já que não houve quantificação de amônia ou nitrito. Song et al. (2014) utilizando amostras provenientes de um sistema municipal de tratamento de efluentes verificaram a expressão do gene *nosZ* (codifica a N_2O redutase), onde foi possível relacionar a expressão desse gene com a produção do N_2O .

Assim, observa-se que a expressão gênica é uma medida que permite visualizar modificações nas expressões dos genes envolvidos no metabolismo das bactérias. Essa modificação pode refletir ou não, o que é observado pelo monitoramento de substratos e produtos da reação. O que a torna uma metodologiacada vez mais utilizada na área de ambiental, para tentar compreender e talvez prever modificações no comportamento do microrganismo.

Poucas pesquisas tem sido feitas visando verificar como bactérias nitritantes respondem a tóxicos, especialmente NPAG, em nível molecular. Isso demanda mais estudos nessa área, até mesmo para determinar a sensibilidade do método para amostras ambientais (KIM et al., 2013). Assim, se for possível verificar a expressão dos genes e relacionar essa resposta com o monitoramento de cinéticas (formação de produtos), será possível aprimorar a atual compreensão das rotas metabólicas utilizadas pelas bactérias em determinadas situações. O que permitirá prever qual será a resposta do reator variações ambientais, bem como a expressão gênica como um indicador de efeito tóxico.

4 METODOLOGIA

Os métodos descritos a seguir foram realizados em dois períodos diferentes. Os experimentos realizados com cultura pura, foram realizados na Rice University (Houton, TX, EUA), no laboratório coordenado pelo professor Pedro J.J. Alvarez. E, o que forma efetuados com cultura mista foram desenvolvidos na Universidade Federal de Santa Catarina, no Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR), coordenado pelo professor Hugo Moreira Soares.

4.1 CULTIVO DE CULTURA PURA DE *NITROSOMONAS EUROPAEA*

Utilizou-se a bactéria ATCC 19718 (*Nitrosomonas europaea*), adquirida através da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA). Ela é responsável pela oxidação do íon amônio em nitrito no processo de nitrificação. Essa espécie foi escolhida por ser amplamente reportada na literatura, tendo seu metabolismo relativamente conhecido, e por ser sensível a alterações no meio. Deste modo, o efeito tóxico de compostos sobre bactérias do ciclo do Nitrogênio pode ser percebido com maior facilidade (YANG et al, 2012b). A bactéria foi cultivada em reator retangular de poliestireno esterilizado (Corning®), incubada a 26°C, no escuro, durante 7 dias, sendo agitada constantemente a 200 – 250 rpm (80 mL).

4.2 MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado foi o número 2265, sugerido pela ATCC para esta espécie. Este meio é preparado em etapas, sendo utilizadas três soluções diferentes, que devem ser filtradas com um frasco estéril (garrafa com sistema de filtração e armazenamento, com membrana PES de poro de 0,22µm e área de 54,5 cm², estéril, da Corning®). Após a filtração, o meio foi armazenado em frasco estéril (Corning®, linha CellBIND). A Tabela 1 mostra os compostos e seus respectivos volumes ou massas para preparar 1,512 L de meio, conforme indicado no método fornecido pela empresa.

Tabela 1 Meio nutritivo 2265 para a bactéria ATCC 19718

Composto	Massa ou volume
Solução 1	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (para 50mM NH ₄ ⁺)	4,95 g
KH ₂ PO ₄	0,62 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,27 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04 g
Cont. Tabela 1 Meio nutritivo 2265 para bactérias ATCC 19718	
Composto	Massa ou volume
FeSO ₄ (30mM em EDTA, 50 mM, em pH 7)	0,5 mL
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,2 mg
Água destilada	1,2 L
Solução 2	
KH ₂ PO ₄	8,2 g
NaH ₂ PO ₄	0,7 g
Água destilada	300 mL
Elevar o pH até 8 com NaOH 10N	
Solução 3	
Na ₂ CO ₃	0,6 g
Água destilada	12,0 mL

4.3 NANOPARTÍCULA DE PRATA E NITRATO DE PRATA

4.3.1 Para os ensaios com cultura pura

A nanopartícula utilizada nos testes foi adquirida da Novacentrix (com 35 nm de diâmetro, com cobertura de carbono amorfo e potencial zeta de $-34,10 \pm 0,57$ mV), caracterizada por Yang e colaboradores (2013a). Foi feita uma solução concentrada desta NPAg (10 g.L⁻¹) o qual foi estocada em câmara anaeróbia. Alíquotas variadas dessa solução foram utilizadas nos experimentos. O nitrato de prata (Sigma Aldrich, ~99%) foi utilizado para fornecer os íons de prata. Também foi feita uma solução estoque deste composto (10 mg Ag⁺_AgNO₃.L⁻¹).

4.3.2 Para os ensaios com cultura mista

A nanopartícula utilizada nos testes foi adquirida da mesma empresa (Novacentrix), com diâmetro indicado pelo fabricante de 25 nm (Anexo 0). Sua caracterização foi confirmada pelos testes indicados no item a seguir 4.3.2.1 (página 57). Para cada teste foi preparada uma

solução estoque, com água ultrapura e sem oxigênio, com a concentração adequada para cada teste. Alíquotas variadas dessa solução foram utilizadas nos experimentos. O nitrato de prata (Sigma Aldrich, ~69%) foi utilizado para fornecer os íons de prata. Também foi feita uma solução estoque deste composto para cada teste (10 mg $\text{Ag}^+_{\text{AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}}$).

4.3.2.1 Caracterização da nanopartícula de prata

A nanopartícula de prata utilizada foi adquirida da Novacentrix (Texas, EUA), e segundo o fabricante, possui 25 nm de diâmetro, com revestimento de carbono amorfo. Porém, para confirmar essa informação porá partícula foi caracterizada sob alguns aspectos considerados importantes para o desenvolvimento deste trabalho, como tamanho de partícula e potencial zeta. Essa caracterização foi feita para a nanopartícula utilizada nos experimentos de cultura mista. Para os ensaios de cultura pura, a nanopartícula utilizada já havia sido previamente caracterizada pelos demais estudantes envolvidos na pesquisa.

4.3.2.1.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Para visualizar e mensurar o tamanho e a forma das nanopartículas foi utilizado um microscópio de transmissão eletrônica (JEM-1011 TEM), localizado no LCME, UFSC. O preparo de amostra foi apenas diluir as amostras em álcool isopropílico e deixa-las em banho de ultrassom por 20 minutos. E, após isso, foi colocada uma gota de amostra sobre o grid de 200 Mesh, de cobre, com uma fina camada de carbono (CF200-Cu, Electron Microscopy Sciences). Foram deixados secar por 48 horas e armazenados para serem visualizados no microscópio.

4.3.2.1.2 Medida do potencial zeta

Para esta análise foi utilizado o equipamento Zetasizer nano ZS (Malvern). O ensaio foi realizado no LaCBio (Laboratório de Catálise Biomimética), localizado do departamento de Química da UFSC. A amostra foi diluída em água, e sonicada por 20 minutos. Após esse período, foi colocada em uma cubeta específica para o equipamento e feita a medida. Para definir brevemente o potencial zeta, deve-se pensar que as partículas em contato com um líquido, são dotadas de carga na sua superfície, que afeta a distribuição de cargas em seu redor, formando uma dupla camada elétrica na interface líquido/partícula. Assim, quando

há movimento da partícula, a nuvem de cargas se desloca junto com a ela, como se fosse uma unidade. O potencial zeta é medido onde ocorre o cisalhamento dessas cargas, com as que não se deslocam com a partícula (BEDÊ, 2010).

4.4 TESTE DE INIBIÇÃO EM BATELADA PARA CULTURA PURA

O efeito tóxico das nanopartículas e dos íons de prata foram determinadas através de quatro métodos: viabilidade celular, medida através de microscopia de fluorescência; quantificação do nitrito produzido ao longo do tempo (inibição em batelada) e expressão gênica relativa. Os dois primeiros foram realizados simultaneamente.

A bactéria *N. europaea* foi exposta à diferentes concentrações de NPAg e nitrato de prata (Ag^+), conforme Tabela 2. Foram utilizados frascos de cultivo retangular de poliestireno, esterilizado (Corning®), incubados à 26°C, no escuro, durante 7 dias, sendo agitada a 200 – 250 rpm (Figura 5). O volume final de reação era de 80 mL, que continha 8 mL (10% do volume total) de inóculo, previamente preparado, meio nutritivo e de volumes variados (conforme a concentração testada) de solução estoque de NPAg e Ag^+ .

Figura 5 Frascos de cultivo utilizados para os ensaios de inibição em batelada sobre cultura pura.



Tabela 2 Concentrações de íons de prata e nanopartículas de prata utilizadas no ensaio de inibição em batelada de sobre cultura pura.

Testes	Concentração
1	0 mg L ⁻¹
2	0,075 mg Ag AgNO ₃ L ⁻¹
3	0,075 mg Ag_NPAg L ⁻¹
4	0,25 mg Ag_NPAg L ⁻¹
5	0,5 mg Ag_NPAg L ⁻¹
6	0,75 mg Ag_NPAg L ⁻¹

Foram retiradas amostras nos dias 0, 1, 3, 5 e 7. Para análise de nitrito (item 0) a amostragem foi realizada da seguinte maneira: foram centrifugados 2 mL de amostra a 10.000 rpm, por 1,5 minutos, o sobrenadante foi coletado e posteriormente filtrado com filtro seringa de 0,2 μm de acetado celulose e armazenadas a 4°C. Para a análise de microscopia de fluorescência um método de pigmentação foi utilizado. Para tal era necessário 1 mL de amostra, tratada conforme explicitado no item 4.4.2. O teste foi realizado em duplicata.

4.4.1 Detecção de nitrito

Foram coletadas amostras nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 de cultivo. As quais eram centrifugadas (2 mL) a 10.000 rpm, por 1,5 minutos, o sobrenadante foi coletado e posteriormente filtrado, com filtro seringa de 0,2 μm de acetato celulose e armazenada a 4°C. Para quantificar o nitrito foi utilizado cromatógrafo de íons DX 600, da Dionex. O sistema utilizado continha uma coluna cromatográfica, AS11-HC 4mm, um detector eletroquímico ED 50, ambos da Dionex. O eluente utilizado foi NaOH 30 mM. A faixa de medição era entre 2 e 50 mg $\text{NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$, deste modo, em geral, diluições eram necessárias para que o ponto analisado ficasse dentro da faixa. As diluições foram feitas com água ultra pura.

4.4.2 Microscopia de fluorescência

Após o sétimo dia de exposição foram coletadas amostras para a microscopia de fluorescência. Foram centrifugados 1 mL de cada amostra, a 10.000 rpm, por 2 minutos, à temperatura ambiente. Removeu-se o sobrenadante e lavou-se a amostra com tampão de NaHCO_3 (1mM), duas vezes (centrifugando por 1 minuto, 10.000rpm). Para pigmentar a amostra foi utilizado o fluoróforo Dapi (4'-6-diamidino-2-fenilindol) da Invitrogen (Grand Island, NY), o qual pigmenta apenas o DNA de dupla hélice. A bactéria foi pigmentada de 5-10 minutos, no escuro, com 300 μL de 0,5 mg L^{-1} de DAPI. É importante ter certeza que todas as bactérias estão cobertas pelo corante. Após esse período, 10 μL de amostra foram adicionadas sobre a lâmina para microscópio e coberta pela lamínula. O número de bactérias foi contado a partir de 8 campos microscópicos (com ampliação de 10X). Foi utilizado o Microscópio Invertido Olympus IX71 da *Olympus Corporation of the Americas* (Center Valley, PA). As imagens foram analisadas pelo software *CellSens Dimension*. O branco (sem a presença de prata) foi tratado da mesma maneira e todos foram preparados em duplicata.

4.4.3 Liberação de prata

Para detectar a liberação de prata, em forma de íons (Ag^+), foram realizados os mesmos experimentos de inibição em batelada, expondo a bactéria *N. europaea* a diferentes concentrações de nanopartículas de prata e nitrato de prata, conforme Tabela 2. Foram retiradas alíquotas, em duplicata, nos dias 1, 3, 5 e 7 de cultivo. Um volume de 7 mL de amostra foi filtrado utilizando frascos com membrana filtrante de celulose regenerada, específicos para centrifugação (Centrifugal Filters Units, Amicon Ultra®). O branco (sem prata) foi analisado da mesma maneira. Também foi medida a liberação de prata de 0,075 mg Ag_NPAg.L^{-1} e 0,75 mg Ag_NPAg.L^{-1} , sem a presença de bactérias (controle) na solução. A centrifugação foi feita por 10 minutos a 7.000 rpm, à temperatura ambiente. O filtrado foi coletado e armazenado a 4°C, para posterior análise. Todas as amostras foram diluídas com HNO_3 , 1%. O equipamento utilizado para medir a concentração do íon de prata (Ag^+) foi um ICP-MS, espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, Elan 9000 (Perkin Elmer SciEx). A faixa de detecção está entre 1 ppb e 32 ppb.

4.4.4 Extração de RNA– Efeito da prata (NPAg e Ag^+) na expressão dos genes

Visando verificar o efeito da prata, tanto das nanopartículas quanto dos íons, na expressão dos genes foi realizada a extração do RNA. A bactéria *N. europaea* foi cultivada até o terceiro dia. No segundo dia foi adicionada a nanopartícula de prata (concentrações de 0,075 mg Ag_NPAg.L^{-1} e 0,75 mg Ag_NPAg.L^{-1}) e nitrato de prata (concentração de 0,075 mg $\text{Ag}^+_{\text{AgNO}_3.L}^{-1}$). Após esse período elas foram coletadas para a extração de RNA. Como padrão interno o gene constitutivo *gapA* foi utilizado, pois possui uma expressão teoricamente constante, sofre pequenas oscilações na expressão reguladas por fatores externos, como compostos tóxicos. Ele codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. A expressão dos genes *amoA1*, *amoA2*, *amoB2*, *amoC2* (catalisam a oxidação da amônia para hidroxilamina), *hao2* (codifica para hidroxilamina oxidoreductase), *cycA1* (catalisa a oxidação da hidroxilamina para nitrito), *sodB* (enzima superóxido dismutase), *nirK* (redução do NO_2^- para NO) foram determinadas.

Todo o processo de extração de RNA foi realizado em uma bancada livre de RNase, com ponteiras adequadas para o procedimento. Para limpar, ou seja, remover RNase, a bancada, pipetas e demais materiais utilizados no processo, foram limpos com lenços para remoção

de RNAase de superfícies (RNaseZap[®] Wipes, Ambion[®]). A água utilizada, assim como todos reagentes também eram livres de RNase. Inicialmente, todo o volume de amostra foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada, 10000 rpm, 4°C, por 10 minutos, ou até ser possível ver um pequeno depósito de células no fundo do tubo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de *RNAprotect Bacteria Reagent*, e removido o excesso de reagente por gravidade. É necessário preservar em ultra freezer, a -80°C, caso for realizar o procedimento em outro momento.

Foram utilizados dois kits para extração do RNA e síntese do cDNA, o *RNeasy Mini Kit* e o *Qiaquick PCR Purification Kit*, ambos da Qiagen[®]. Os reagentes necessários, que não acompanham o kit, foram preparados antes do início do procedimento. O tampão Tris-EDTA (TE buffer), em pH 8, com 400 µg.mL⁻¹ para bactérias Gram-negativas, ou 3 mg.L⁻¹ de lisozima, para Gram-positivas. Nesse estudo foram utilizados o tampão Tris-EDTA da Sigma-Aldrich, e a lisozima da mesma marca. Ao tampão RLT, fornecido no kit, foi adicionado β-Mercaptoetanol (para cada 1 mL do tampão RLT, foi adicionado 1µL de β-Mercaptoetanol, que é estável por 30 dias). Para se obter o resultado em expressão gênica, são necessárias algumas etapas: a extração do RNA, conversão para cDNA e posteriormente a análise em PCR quantitativo.

4.4.4.1 Extração do RNA

Após retirar a amostra do ultrafreezer, elas foram tratadas com 200µL de 400 µg.mL⁻¹ do tampão Tris-EDTA, deixando reagir por 5 minutos, sob agitação leve, em temperatura ambiente. Seguiu-se o procedimento indicado pelo fabricante, adicionando a etapa de limpeza de DNA.

Ao terminar a extração de RNA, mediu-se a sua concentração no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 da *Nanodrop Products Inc.* O RNA extraído foi conservado a -80°C. Para obter-se a expressão dos genes, foi sintetizado o cDNA, a partir do RNA, utilizando o *Qiaquick PCR purification Kit*.

4.4.4.2 Síntese do cDNA

Para sintetizar o cDNA, primeiramente, diluiu-se o RNA para que todas amostras ficassem com a mesma massa (2 a 5 µg), em um volume total de 16,9 µL, sendo 5 µL de 3 mM de *Random Hexamer Primers*, para cDNA, e o restante de RNA mais água, quantidade suficiente para o volume final chegar em 16,9 µL. A mistura foi desnaturada a 70°C,

por 10 minutos, e imediatamente colocada no gelo, por 10 minutos. O material foi centrifugado brevemente (30 segundos) e o procedimento prosseguiu a temperatura ambiente. Em outro vial preparou-se uma mistura contendo: 6µL de tampão 5X *First Strand Synthesis Buffer*, 3µL de tampão 0,1M DTT, 1 µL RNaseOUT, 1,2 µL 25X dNTPs (3 adUTP, 12,5 mM dNTPs), 2 µL de *Superscript II Reverse Transcriptase*. Adicionou-se esses 13,2 µL à mistura de RNA desnaturado.

A mistura foi incubada de um dia para o outro, a 42°C. Em seguida o RNA foi hidrolisado através da adição de 10 µL de NaOH, 1M e 10 µL de 0,5M de EDTA, pH 8. Incubou-se novamente a 65°C por 15 minutos. Para neutralizar o pH, foi adicionado 10 µL de HCl, 1M.

Após o término dessa etapa utilizou-se o kit de purificação de DNA, conforme o método sugerido pelo fabricante. A concentração do cDNA foi medida com o espectrofotômetro Nanodrop (ND 1000).

4.4.4.3 Análise quantitativa de PCR

A concentração do DNA deve estar em torno de $2\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para fazer a análise quantitativa de PCR. Assim, diluiu-se a amostra até esta concentração. Os primers utilizados foram desenhados usando o PrimerQuest®, disponível no site IDTDNA (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) e estão listados na Tabela 3. Os *primers* utilizados aqui foram utilizados por Yang e colaboradores (2013a), com exceção do *nirK* forward e *nirK* reverse que foram sugeridos por Jason e colaboradores (2007). Os primers foram: *amoA1*, *amoA2*, *amoB2*, *amoC2*, *vhoa2*, *cycA1* e *nirK*.

A análise de PCR quantitativa foi realizada utilizando um termociclador 7500 de PCR em tempo real da Applied Biosystems (Carlsbad, CA). Cada 15µL de volume de reação deve conter 1 ng de cDNA, 7,5 µL do pigmento Syber Green (SYBR green Master Mix) e 0,3 µM de cada primer e água. Os valores de Ct (limite do ciclo) foram calculados utilizando o software S.D.S versão, 1.3.1. Todo o experimento foi feito em triplicata, tanto o ensaio, quanto as amostras durante o teste de PCR. A temperatura de anelamento utilizada foi de 60°C para todos primers.

Os resultados foram analisados e quantificados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ sugerido por Livak e Schmittgen (2001). A fórmula utilizada para os cálculos é descrita conforme Equação 5 e 6:

$$\Delta\Delta C_{T,gene\ alvo} = (C_{T,gene\ alvo} - C_{T,gene\ constitutivo})_{Ag} - (C_{T,gene\ alvo} - C_{T,gene\ constitutivo})_{controle} \quad \text{Equação 5}$$

$$\text{Mudança da expressão em relação ao gene alvo} = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

$\Delta\Delta C_{T,gene\ alvo}$ – Variação entre os C_t (*cycle threshold*) da amostra que exposta à prata e ao controle (sem a prata);

$C_{T,gene\ alvo} - C_t$ do gene alvo;

$C_{T,gene\ constitutivo} - C_t$ do gene constitutivo.

Nesse estudo o gene constitutivo *gapA* foi utilizado como padrão interno.

Tabela 3 Primers utilizados na análise de expressão gênica

Nome do primer	Sequência
<i>amoA1</i> forward	5'-CAACGATTGGCAAATGGGTTGGTC-3'
<i>amoA1</i> reverse	5'-CTTCACGCTGTATCTGACACGCAA-3'
<i>amoA2</i> forward	5'-CAACGATTGGCAAATGGGTTGGTC-3'
<i>amoA2</i> reverse	5'-CTTCACGCTGTATCTGACACGCAA-3'
<i>amoB2</i> forward	5'-TCAGAATGGCAAGTACCCAGGTGA-3'
<i>amoB2</i> reverse	5'-TCGTGTATTGTTGGCCTACGGTGA-3'
<i>amoC2</i> forward	5'-CAGAATCATCAACGGGCCTGCAAT-3'
<i>amoC2</i> reverse	5'-CATCGTTTGCGGTGTGCAACCTA-3'
<i>hao2</i> forward	5'-GGTCTGCTTGCCTTCCAGTTTGT-3'
<i>hao2</i> reverse	5'-TCCGATGAACCGTGCCTATGTTGA-3'
<i>cycA1</i> forward	5'-CATGCGCTGTGTCTTCCACGATT-3'
<i>cycA1</i> reverse	5'-TGCTGCAGCTTTGTTTCACTGAC-3'
<i>sodB</i> forward	5'-GATCCAAGCTGGCCATCATCAAGA-3'
<i>sodB</i> reverse	5'-TAACCGTGTGACATAATCCGGGC-3'
<i>nirK</i> forward	5'- GTWCCSGGTCCGGTYGTRCG-3'
<i>nirK</i> reverse	5'- TCRTTGGGWCCRGCRRTTGAC-3'
<i>gapA</i> forward	5'-ATCGTCTTTGGACGGAGCACTCAA-3'
<i>gapA</i> reverse	5'-AGTGGGATGAAGTTGGTGCGGATA-3'

4.5 ANÁLISES COM CULTURA MISTA

4.5.1 Cultura mista

A fim de investigar como as nanopartículas de prata agem sobre uma cultura mista, enriquecida em bactérias oxidadoras de amônia, foram realizados testes que estão descritos a seguir.

4.5.1.1 Meio de cultivo

O meio de cultura utilizado foi baseado em dois meios, o meio proposto por Campos e colaboradores (1999), que vem sendo utilizado no LTBR para cultivo e enriquecimento das bactérias nitrificantes (ZDRADEK, 2005; FERRETI, 2009; MICHELS, 2011) e o meio proposto por Choi e colaboradores (2008). Neste estudo, alguns sais foram substituídos por sais de nitrato para minimizar a complexação com os íons de prata (Ag^+) com o Cl^- , S^{2-} , PO_4^{3-} e SO_4^{2-} . Entretanto, não foi possível substituir o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por NH_4NO_3 , pois a venda desse composto é controlada pelo exército, fato que dificulta seu acesso. Dessa forma optou-se pelo sulfato de amônio, por ser, entre os possíveis ligantes, o que menos reduz o efeito tóxico da NPAg e Ag^+ (CHOI et al., 2008). Assim, o meio foi composto pelas mesmas concentrações de nutrientes de interesse do meio proposto por Campos, porém, substituído os mesmos por sais com menor possibilidade de complexar com a prata, sugeridos por Choi e colaboradores (2008). Portanto, a composição do meio nutritivo utilizado é mostrada pelas Tabela 4 e Tabela 5 e Vale ressaltar, também, que a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaHCO_3 variou conforme a progressão de carga que foi aplicada (entre 2,35 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,5 gN_ NH_4L^{-1} e 4,7193 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1gN_ NH_4L^{-1}) e o bicarbonato de sódio, conforme a estequiometria da reação de nitritação (Equação 1).

Tabela 4 Composição do meio de cultura sintético para cultura mista.

Macronutrientes	
Composto	g.L ⁻¹
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,7193
KH_2PO_4	0,2220
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	0,0321
NaHCO_3	11,88
NaNO_3	1,2914
Solução de micronutrientes	0,44 mL.L ⁻¹

Tabela 5 Composição da solução de micronutrientes para cultura mista.

Micronutrientes	
Composto	g.L ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂	1,79
FeCl ₂ .4H ₂ O	3,57
MnSO ₄ .H ₂ O	4,32
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,87
CuSO ₄	1,53
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	25,35
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,40

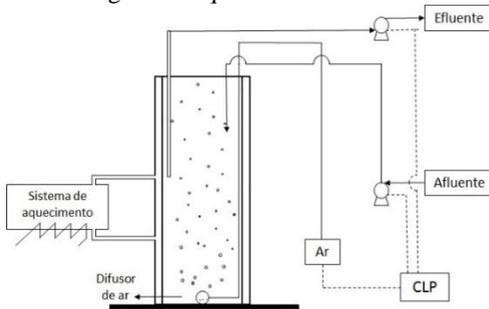
4.5.1.2 Inóculo

Para inocular o reator nitritante foi utilizada 200 mL de biomassa que já estava sendo adaptada em outro reator, que também visava a nitrificação parcial. Esse, por sua vez, foi inoculado com biomassa de lodos ativados coletado do sistema de tratamento de esgotos da CASAN, do município de Florianópolis.

4.5.1.3 Reator

Inicialmente foi operado um reator (Reator A) com o objetivo de aumentar a concentração celular (biomassa). Posteriormente, o cultivo foi transferido para um de maior volume (Reator B). Para dar partida no reator A, utilizou-se um frasco cilíndrico, com 50 cm de altura e 9 cm de diâmetro, com volume útil de 1,5 L, inoculado com 1,38 g SST.L⁻¹. Não havia sistema de agitação mecânica. O ar era injetado pelo fundo do reator, forçando a suspensão da biomassa nos períodos aerados. Quando a aeração era desligada a biomassa decantava (no item 4.5.1.4, a seguir, é abordado o modo de operação dos reatores). A alimentação e descarte eram realizados por bombas peristálticas Masterflex L/S, com cabeçote Easy-load II, da mesma marca. Para aeração, foi utilizada com bomba compressora de ar, (BIG AIR[®], modelo A420), sendo tudo controlado com auxílio de um CLP (controlador lógico programável, Dexter, modelo µDX, série 100). O TRH era de 1 dia e o reator foi mantido a 32±1 °C, através de um sistema de recirculação de água na parte externa no reator, semelhante a uma camisa de aquecimento (Figura 6).

Figura 6 Esquema ilustrativo do reator A.



Após o período de 50 dias, esse reator foi substituído por outro. Sendo este reator (Reator B) definitivo para a produção de biomassa nitritante necessária nos experimentos (Figura 7). O reator era de acrílico, com 53 cm de altura e 17,7 de diâmetro, com 13 L, sendo 8 L de volume útil, com agitação mecânica (Agitador Dist 930). O sistema de agitação era constituído por um sistema de pás, suficiente apenas para não decantar a biomassa (o sistema não possuía regulação de controle de rotação, devido a isso, não é possível afirmar a rotação exata utilizada). O reator foi aerado de forma ascendente, sob as pás de agitação, visando reduzir o tamanho da bolha e melhorar a transferência de oxigênio. Assim como no reator A, a temperatura foi mantida em $32 \pm 1^\circ \text{C}$, através de um sistema de recirculação de água na parte externa no reator. Os sistemas de controle, bombas, aeração e aquecimento foram os mesmos utilizados no Reator A.

Figura 7 Foto do Reator B.



4.5.1.4 Operação dos reatores

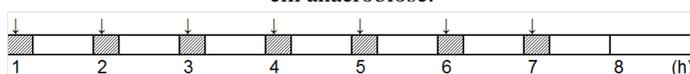
O modo de operação dos dois reatores foi semelhante, em processo descontínuo alimentado. As diferenças consistiram no volume útil e no sistema de agitação (Tabela 6).

Tabela 6 Condições de cultivo dos reatores nitrificantes

	Reator A	Reator B
Volume do reator (L)	1,5	8
Vazão ($L \cdot d^{-1}$)	1,5	3
TRH (dia)	1	2,67
$[N_NH_4^+]$ ($mgN_NH_4^+ \cdot L^{-1}$)	750	De 500 à 700
Carga ($mgN_NH_4^+ \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$)	750,00	De 187,26 à 374,53
Sistema de agitação	Ausente	Agitação mecânica (sistema de pás)

Para induzir a aclimação e seleção da biomassa nitrificante foram aplicados períodos aeróbios, intercalados com anaeróbios tanto no reator A como no B. Foram aplicados 3 ciclos de 8 horas cada, sendo 7 horas de reação e 1 hora para decantação e descarte. Durante as 7 horas, a cada hora, o reator foi aerado por 15 minutos e seguido de 45 minutos de anaerobiose (Figura 8). Essa estratégia é utilizada para limitar a concentração de oxigênio dissolvido presente para a oxidação da amônia, e reduzir a oxidação de nitrito para nitrato (ZDRADEK, 2005). A alimentação era realizada durante a aeração. Essa estratégia de alimentação permite que a alcalinidade e o substrato (nitrogênio amoniacal) sejam distribuídos ao longo do ciclo. Tal procedimento foi adotado a fim de evitar a ausência de amônia no final das 7 horas de reação, o que poderia levar a oxidação do nitrito. Além disso, ao adicionar-se a alcalinidade, adicionada ao reator na forma de bicarbonato de sódio, de uma só vez, pode ocorrer a perda da alcalinidade devido ao arraste de CO_2 pela aeração no início de cada ciclo (BREISSAN, 2012).

Figura 8 Esquema de operação do reator B, onde ↓ representa o início da adição de meio nutritivo; ▨ demonstra os períodos aerados e □ demonstra os períodos em anaerobiose.



4.5.1.5 Monitoramento dos reatores

Para o monitoramento dos reatores foram coletadas amostras três vezes por semana, medindo-se a concentração de nitrogênio nas formas de íon amônio, nitrito e nitrato. O pH foi monitorado diariamente com pHmetro portátil, da marca LT lutron, modelo PH221. O oxigênio dissolvido foi medido visando acompanhar a concentração de O_2 durante o ciclo, utilizando o Oxi 340/SET (marca WTW). A análise de sólidos suspensos voláteis, para monitorar a concentração da biomassa, foi realizada a cada 15 dias. .

4.5.1.6 Teste de inibição em batelada sobre bactérias nitrificantes

Esse teste visou determinar a concentração de prata que inibe 50% de atividade nitrificante (KI50), quando as BOA são expostas à NPAg e Ag^+ .

Para isso, as BOA foram expostas a diferentes concentrações de NPAg e Ag^+ em frascos agitados (150 rpm) em um shaker orbital, com temperatura controlada em $32 \pm 1^\circ C$. Foram utilizadas as duas formas de prata (nanopartícula e íon) para comparar os efeitos de cada uma. Cada frasco foi inoculado com aproximadamente 0,5 g $SSV.L^{-1}$, com biomassa proveniente do reator B. O volume de reação foi de 200 mL, sendo que a solução contendo prata foi adicionada somente no final do preparo de cada um, para iniciar o experimento no momento em que o composto tóxico for adicionado.

Para realização do estudo cinético foram retiradas 3,5 mL de amostra com biomassa suspensa, para manter a concentração celular no reator, a cada 90 ou 120 minutos, dependendo do consumo de substrato. Foram monitorados o consumo de amônia, formação de nitrito e nitrato. A duração do teste foi dependente da concentração de amônia (substrato) no frasco de controle (sem prata), ou seja, quando alcançasse valores próximos a zero, a cinética era encerrada. Optou-se por determinar o tempo de ensaio desta forma, pois já era possível calcular as velocidades de consumo nos testes com prata. As amostras que continham nanopartículas de prata foram centrifugadas (Centrífuga Eppendorf 5804R) em frascos com membrana filtrante de celulose regenerada, específicos para centrifugação (Centrifugal Filters Units, Amicon Ultra[®]), visando remover as nanopartículas das amostras que foram injetadas no cromatógrafo. Após a centrifugação as amostras foram armazenadas a $4^\circ C$.

Para os ensaios de inibição em batelada, a concentração de amônia e bicarbonato de sódio foram reduzidas. Visando manter nos frascos a mesma carga de nitrogênio que havia no reator.

As concentrações de NPAg testadas foram maiores que as testadas na cultura pura. No caso da cultura mista, é sabido que os sais presentes no meio podem complexar a prata e reduzir o seu efeito tóxico. Também foi superior a concentração de íon de prata, pois, em geral, este apresenta maior capacidade inibitória que a NPAg. As Tabela 7 e Tabela 8 mostram as concentrações utilizadas nos testes de inibição em batelada.

Tabela 7 Concentrações de nanopartícula de prata utilizadas em ensaio de inibição em batelada.

Testes	Concentração (mg Ag_NPAg.L ⁻¹)
0	0,00
1	5,00
2	10,00
3	15,00
4	20,00

Cont. Tabela 7 Concentrações de nanopartícula de prata utilizadas em ensaio de inibição em batelada.

Testes	Concentração (mg Ag_NPAg.L ⁻¹)
5	25,00
6	30,00

Tabela 8 Concentrações de nitrato de prata utilizadas em ensaio de inibição em batelada.

Testes	Concentração (mg Ag ⁺ _AgNO ₃ .L ⁻¹)
0	0,00
1	0,10
2	0,20
3	0,40
4	0,60
5	0,80

É importante ressaltar que as soluções concentradas contendo prata, seja do íon ou da nanopartículas, foram feitas sempre

considerando a massa de prata na molécula ou partícula. No caso da nanopartícula, o fabricante informa que 3% da massa corresponde à cobertura de carbono amorfo. Deste modo, isso foi levado em consideração para o cálculo da massa necessária para a preparação das soluções estoque de NPAg ou Ag⁺.

No final do ensaio cinético com nanopartículas de prata, foi retirada uma alíquota de 10 mL, a qual foi centrifugada (Centrífuga Eppendorf 5804R, à 5000 g, por 15 minutos), para verificar a liberação de íons de prata durante o teste (Vide item 4.5.2.1) para todas concentrações testadas.

4.5.1.7 Teste de inibição em processo contínuo sobre bactérias nitritantes

Este teste avaliou a influência das nanopartículas de prata sobre a comunidade de bactérias nitritantes durante períodos longos de exposição. Para tal, foi preparado um reator de bancada com o mesmo regime de operação do reator B (vide Figura 8), porém com um volume de 1,5 L. A alimentação continha aproximadamente 700 mg N₂NH₄⁺.L⁻¹, entre os outros nutrientes e micronutrientes listados na Tabela 4 e Tabela 5. O reator foi operado como controle (sem NPAg) até atingir a estabilidade. Após esse período, adicionou-se nanopartículas de prata conjuntamente à alimentação, cuja concentração dependia do valor que seria testado. Para preparar a solução de NPAg a qual era adicionada ao meio nutritivo, foi utilizada água ultrapura, submetida a borbulhamento com argônio, para remoção de oxigênio, seguida da adição de prata. Em seguida a solução foi submetida à sonicação por 20 minutos. Após essas etapas, adicionava-se uma alíquota à alimentação. Para verificar a inibição em processo contínuo, optou-se por duas concentrações, 4,53 mgAg₂NPAg.L⁻¹ e 1,32 mgAg₂NPAg.L⁻¹, sendo estas escolhidas tendo como base os resultados obtidos durante os ensaios de inibição em batelada.

Para investigar a influência dessas nanopartículas foram monitorados o consumo de substrato e a formação dos produtos da oxidação da amônia (concentrações do íon amônio, nitrito e nitrato), antes (controle) e depois da adição de NPAg, ao longo de toda a operação do reator.

O oxigênio dissolvido também foi medido, porém somente durante um ciclo de operação do reator (duração de 8 horas), tanto na etapa controle como após a exposição à prata. Ao final deste ciclo, foram coletadas amostras de sobrenadante e de biomassa para a

quantificação de prata que teria sido liberada da nanopartícula e que estava aderida a biomassa (Vide item 4.5.2.1, página 72).

4.5.1.8 Influência do tempo de exposição da nanopartícula de prata sobre a cultura mista

Para examinar se o tempo de exposição da nanopartícula de prata sobre com cultura bacteriana influencia em sua atividade, foi realizado este ensaio. Para tal, foram escolhidas três concentrações de nanopartículas (4,53, 2,56 e 1,32 mgAg_NPAg.L⁻¹), mais um ensaio controle, sem NPAg. Todos foram monitorados por 5 dias (tempo determinado em testes prévios). As concentrações, mínima e máxima, foram as mesmas testadas durante a inibição em processo contínuo.

Em cada ensaio (para cada uma das concentrações de NPAg) foram utilizados 5 erlenmeyers aletados, sendo que todos foram inoculados com a mesma quantidade de biomassa, solução nutritiva (sem substrato) e de nanopartículas de prata. Mantidos a aproximadamente 32°C, com agitação suficiente para manter a biomassa suspensa, em shaker orbital. A cada dia de ensaio, em um frasco era adicionado 20 mL de solução de sulfato de amônio para que a concentração dentro do frasco ficasse em 400 mg N_NH₄⁺.L⁻¹. E a partir desse dia, eram retiradas amostras deste frasco, durante 5 dias, para monitorar o consumo de substrato e formação de produtos da nitrificação. No dia seguinte à adição de substrato ao frasco 1, em outro frasco (frasco 2) era dado o mesmo pulso de amônia, e este também era monitorado da mesma maneira. Isso foi realizado sucessivamente, para todos os frascos, sendo que o primeiro foi exposto à prata por apenas um dia, e assim continuamente, até que o último a receber amônia, havia sido exposto por cinco dias.

Para levar em consideração a influência da falta de substrato na atividade nitritante, também foram feitos concomitantemente cinco frascos controle, onde não havia prata.

4.5.1.9 Influência da nanopartícula de prata e do íon de prata na morfologia bacteriana

Após os testes de inibição em batelada, foram selecionadas três concentrações de íon de prata e nanopartícula de prata para a visualização no microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL JSM-6390LV), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (UFSC).

Foram realizados os mesmos testes da inibição em batelada (Item 4.5.1.6), com concentrações selecionadas de Ag^+ e NPAg (a mínima e a máxima de cada ensaio e uma concentração intermediária). Para NPAg: 5, 10,75 e 30 mg Ag_NPAg.L^{-1} . Para Ag^+ : 0,1, 0,36 e 0,80 mg $\text{Ag}^+_{\text{AgNO}_3}.\text{L}^{-1}$.

Para o preparo da amostra, após 12 horas de exposição à prata, foi utilizado o método proposto por NATION (1983) e adaptada por VARESCHE (1997), conforme descrito brevemente a seguir. Após o ensaio, 10 mL de amostra foram centrifugados, sendo o sobrenadante removido. Após isso, foi adicionado 5 a 8 vezes o volume do *pellet* formado de solução tampão fosfato 0,1M pH 7,3 + solução 2,5% (m/v) de glutaraldeído (MERK, específico para microscopia) e acondicionado por 12 horas, a 4° C. Posteriormente, a amostra foi lavada 3 vezes com solução tampão fosfato 0,1M pH 7,3, sendo que em cada lavagem o *pellet* ficou em contato por 30 minutos com o tampão. Em seguida, a amostra foi submetida à desidratação gradual em etanol 50, 70, 80, 90, 95%, por dez minutos em cada etapa e por último, foi lavada 3 vezes em etanol 100% (grau PA).

Após a desidratação as amostras foram levadas para o LCME, onde foram colocadas sobre suportes metálicos, secos com HMDS (hexadimetil disilazona), por 30 segundos e levados a estufa a 30° C por duas horas. Em seguida, foram recobertos com ouro e armazenados sob vácuo até a data da visualização no MEV.

4.5.2 Determinações físico-químicas do meio, do efluente do reator e dos ensaios cinéticos

4.5.2.1 Determinação da concentração de íon de prata liberado ao meio.

Ao final dos testes de inibição em batelada com nanopartícula de prata (item 4.5.1.6) e dos dias de monitoramento da inibição em processo contínuo (item 4.5.1.7) foram coletadas alíquotas de sobrenadante que foram submetidas a centrifugação, de 15 a 20 minutos, à 5000 g (Centrífuga Eppendorf 5804R). Os frascos utilizados para a centrifugação eram diferenciados, possuíam membrana filtrante de celulose regenerada, específicos para centrifugação (Centrifugal Filters Units, Amicon Ultra®).

Durante o ensaio de inibição em processo contínuo foram coletados aproximadamente 14 mL de volume do reator homogêneo. A biomassa ali presente foi submetida a digestão ácida para a detecção da

prata presente nas bactérias. Após esse tratamento, tanto o sobrenadante como a biomassa digerida, foram submetidas a análise de ICP-MS no Laboratório de Espectrometria Atômica, localizado no Departamento de Química, da UFSC (equipamento da marca Perkin Elmer, modelo NexIon 300 D, Shelton, USA). O limite mínimo de detecção variou conforme as condições do equipamento.

4.5.2.2 Determinação de nitrogênio amoniacal

A análise do íon amônia foi realizada pelo método sugerido por Vogel (1981). É um método colorimétrico, que utiliza o reagente Nessler. Esse reagente foi preparado utilizando hidróxido de sódio para dissolver o iodeto de mercúrio e iodeto de potássio. A adição deste reagente na amostra contendo amônia forma $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_2$. Essa substância possui cor alaranjada, é um coloide que precipita ao longo do tempo. A absorbância desse composto foi lida em 525 nm. A faixa de 1 até 15 $\text{mgN_NH}_4\text{L}^{-1}$.

4.5.2.3 Determinação de nitrito

A determinação íon nitrito foi realizada de duas maneiras. Para a análise de rotina dos reatores (B e o do reator utilizado no ensaio de inibição em processo contínuo) foi realizado teste colorimétrico, utilizando o Kit NitriVer2, da marca Hach, pelo método 8153, descrito pelo fabricante. Nesse método o nitrito é reduzido à óxido nitroso pelo sulfato ferroso em meio ácido. O composto formado possui coloração esverdeada. Após adição e dissolução do reagente, espera-se 10 minutos, em seguida foi realizada a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro (Hach, modelo DR 5000), em 585 nm. A faixa de abrangência do método é de 2 a 45 $\text{mg N_NO}_2\text{L}^{-1}$.

Para os ensaios cinéticos, devido ao grande número de amostras, optou-se por efetuar as análises em cromatógrafo iônico da marca Dionex, modelo ICS 5000. O sistema possui detector condutivimétrico com supressão eletrolítica. Para separação dos ânions utilizou-se coluna capilar IonPac AS18-Fast (0,4 x 150 mm) e pré-coluna IonPac AG18-Fast (0,4 x 35 mm), ambas da marca Dionex, com volume de injeção de 0,4 μL e vazão de eluente de 0,012 ml.min^{-1} .

4.5.2.4 Determinação de nitrato

O nitrato também foi determinado de duas maneiras, dependendo do ensaio. Para acompanhamento do efluente do reator de cultivo de biomassa (B) e do reator no ensaio de inibição em processo contínuo,

utilizou-se métodos colorimétricos. Para os ensaios cinéticos, foi utilizada cromatografia iônica.

Para análise colorimétrica foi utilizado o método sugerido por Cataldo e colaboradores (1975). Este método é baseado na complexação do ácido salicílico pelo íon nitrato, em meio ácido. A leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro (marca Hach, modelo DR 5000) no comprimento de onda de 410 nm. O limite máximo de leitura é de 70 mg N-NO₃⁻.L⁻¹.

Nos ensaios cinéticos as amostras foram analisadas em um cromatógrafo da marca Dionex, modelo ICS 5000, com a mesma configuração descrita no item anterior (4.5.2.3).

4.5.2.5 Determinação de sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis

A determinação de sólidos suspensos totais foi descrita por Zdradek e colaboradores (2006). Brevemente, a membrana de acetato celulose foi seca em forno de micro-ondas, na potência de 180 watts, por 15 minutos, resfriada em dessecador e pesada. A amostra foi filtrada e submetida, juntamente com a membrana, ao mesmo processo de secagem descrito acima. A determinação da concentração de sólidos, seguiu-se o método gravimétrico descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, onde a biomassa é calcinada a 550°C por 15 minutos (APHA, 2005).

4.6 TRATAMENTO DOS DADOS

4.6.1 Cálculo da viabilidade celular

Para calcular a porcentagem de bactérias que foram coradas com o fluoróforo DAPI (as células viáveis), o seguinte cálculo foi realizado:

$$Y_D = \frac{X_c - X_a}{X_c} \cdot 100\% \quad \text{Equação 7}$$

Onde,

Y_D= Porcentagem de células não marcadas pelo DAPI (%);

X_c = Número de bactérias marcadas pelo DAPI no controle, sem prata;

X_a = Número de bactérias marcadas pelo DAPI nas amostras expostas à NPAG e ao Ag⁺.

4.6.2 Velocidade de produção de nitrito

Para calcular a velocidade de produção de nitrito foram plotados gráficos da variação da produção de nitrito em função do tempo. Foi determinada a tangente da reta gerada que possuía a maior inclinação, determinando a equação da reta que definiu a velocidade procurada.

4.6.3 Velocidade de consumo de íon amônio

Essas velocidades foram calculadas para os ensaios de tempo de exposição à NPAg. Para obtê-las foi feito raciocínio análogo ao explicado no item anterior. Foram plotados gráficos da variação da amônia versus o tempo. Em seguida, foram determinadas as tangentes de cada reta para a determinação da velocidade em questão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CULTURA PURA

Nos itens a seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios realizados em cultura pura *Nitrosomonas europaea*, realizados na Rice University.

5.1.1 Análise de viabilidade celular

A suscetibilidade da bactéria estudada, *Nitrosomonas europaea*, à exposição de diferentes concentrações de nanopartícula de prata (NPAg – 0; 0,075; 0,25; 0,5 e 0,75 mg Ag_{NP}Ag.L⁻¹) e ao íon de prata (0,075 mg Ag⁺_{AgNO₃}.L⁻¹), na forma de nitrato de prata, foi verificada. Para esta análise foram coletadas amostras no sétimo dia de cultivo. A cultura bacteriana foi exposta ao fluoróforo DAPI. O cálculo foi realizado conforme item 4.6.1 e os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 Porcentagem de células não coradas pelo corante DAPI

Concentração de Ag (NPAg ou Ag ⁺)	Redução de bactérias coradas pelo DAPI (%)
0,075 mg Ag ⁺ _{AgNO₃} .L ⁻¹	78±3,0%
0,075 mg Ag _{NP} Ag.L-1	65±19,0%
0,25 mg Ag _{NP} Ag.L-1	78±0,7%
0,5 mg Ag _{NP} Ag.L-1	71±1,4%
0,75 mg Ag _{NP} Ag.L-1	74±0,8%

Esses resultados apontam que, após sete dias de cultivo, o percentual de células que não foram coradas pelo fluoróforo DAPI, ou seja, que não possuíam mais DNA de dupla hélice, foi semelhante para todas concentrações. É interessante ressaltar que a presença de 0,075 mg Ag⁺_{AgNO₃}.L⁻¹ (íon de prata) gerou um resultado semelhante ao causado por 0,25 mg Ag_{NP}Ag.L⁻¹, indicando que o primeiro composto possui efeito tóxico aproximadamente 3 vezes maior que a nanopartícula. Yang e colaboradores (2013a) calcularam a letalidade do íon de prata e chegaram um valor de aproximadamente 80% para a mesma bactéria, com 0,125 mg Ag⁺_{AgNO₃}.L⁻¹. Entretanto, esse corante cora não somente o DNA dentro de uma célula, também pode corar pedaços de DNA que ainda estejam em fita dupla, de células bacterianas que já foram rompidas.

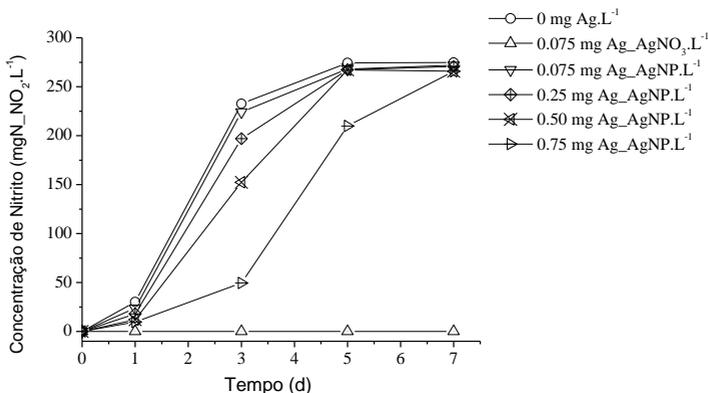
Alguns estudos vêm mostrando que o efeito tóxico das nanopartículas de prata está relacionado, entre outros fatores, a concentração de íons existentes no meio. Beer e colaboradores (2012) estudou diferentes razões entre os íons e as nanopartículas, verificando que quando a presença de Ag^+ é elevada, a viabilidade celular é menor. Assim, aqui, apesar de não ter sido quantificada a liberação dos íons de prata nestes ensaios com NPAg, é possível inferir que o íon é capaz de reduzir a presença de DNA de fita dupla, já que inibiu de forma mais significativa que a NPAg. Outros apontam que um dos mecanismos de ação da nanopartícula de prata gera um rompimento ou desnaturação da membrana plasmática, fazendo com que o material intracelular seja exposto ao meio (YUAN et al., 2013), Portanto, o DNA de fita dupla pode ser corado, mesmo estando em uma bactéria que não possui mais atividade. Por conseguinte, outras análises foram realizadas para melhor compreender o mecanismo de ação das NPAg e Ag^+ sobre bactérias nitrificantes.

5.1.2 Formação de nitrito

O nitrito é produto da oxidação da amônia no processo de nitrificação (Equação 1), realizado pela bactéria aqui estudada (*Nitrosomonas europaea*). Visando averiguar se a nanopartícula de prata e o íon de prata eram capazes de influenciar a produção de nitrito, um estudo cinético de 7 dias foi realizado, retirando pontos nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 para a determinação deste composto.



A Figura 9 apresenta a formação de nitrito ao longo do período de cultivo da bactéria estudada. Foi possível observar que a concentração de nanopartícula de prata utilizada não influenciou na conversão de amônia a nitrito em relação à sua concentração final, a concentração de nitrito produzido, ao final de 7 dias, foi similar, em torno de $270 \text{ mg N}_{\text{NO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$, para todos os experimentos, exceto na presença de $0,075 \text{ mg Ag}^+ \cdot \text{AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, onde não houve a formação do produto.

Figura 9 Produção de nitrito durante os 7 dias de cultivo da *N. europaea*.

Entretanto, nota-se que as curvas de produção de nitrito possuem uma inclinação diferente, para diferentes concentrações de nanopartícula de prata. Em geral pode-se observar a progressão característica análogo ao crescimento microbiano, passando por lag, exponencial e fase estacionária. Porém, para a maior concentração de NPAg (0,75 mgAg₋NPAg.L⁻¹), observa-se que ocorre um retardo na produção do nitrito. Há um prolongamento da fase lag em relação aos outros casos, havendo uma maior inibição da *N. europaea* frente a essa concentração. NPAgCNPAgom as curvas indicadas na Figura 9, identificando os trechos de maior inclinação, NPAgas velocidades e as inibições geradas e estão indicadas na Tabela 10.

Tabela 10 Velocidade de produção de nitrito pela *Nitrosomonas europaea* e a respectiva inibição.

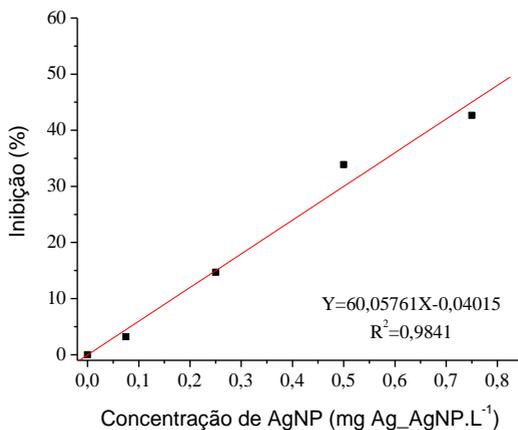
Concentração de Ag ₋ NPAg.L ⁻¹	Velocidade de produção de nitrito (mg N-NO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Inibição (%)
0	80,95	0,00
0,075	78,36	3,20
0,25	69,07	14,68
0,50	53,53	33,87
0,75	46,43	42,64
0,075 Ag ⁺ -AgNO ₃ .L ⁻¹	0,00	100,00

Claramente, à medida que aumenta a concentração de nanopartícula de prata, menor a velocidade de produção de nitrito e

maior a inibição. A velocidade de produção de nitrito caiu 3,20%, 14,68%, 33,87% e 42,64%, para 0,075, 0,25, 0,50 e 0,75 mg Ag_NPAg.L⁻¹, respectivamente. Sendo que as bactérias expostas ao íon de prata não apresentaram atividade. Isso corrobora com alguns estudos que indicam que o íon de prata é o verdadeiro inibidor microbiano (XIU et al., 2012). Entretanto, este íon é capaz de se ligar a compostos presentes em plantas de tratamento de efluentes e também pode formar aglomerados, devido a força iônica do meio, reduzindo seu efeito tóxico, devido a menor liberação dos íons. Por outro lado, as nanopartículas de prata podem ser mais eficazes na sua atividade antimicrobiana, pois libera o íon muito próximo da célula, fazendo com que a sua atividade seja maior em alguns casos (YANG et al., 2014; COLMAN et al., 2013).

Construindo-se o gráfico de correlação: inibição versus concentração de nanopartícula observa-se uma forte relação linear ($R^2 = 0,98$) entre esses dois fatores (Figura 10), sendo o efeito inibitório exclusivamente ligado à dose, neste caso. Os autores que trataram os resultados de forma semelhante também encontraram uma relação linear entre a dose e a inibição, corroborando com os resultados aqui encontrados (RADNIECKI et al., 2011).

Figura 10 Correlação entre o grau de inibição da atividade da cultura pura de *Nitrosomonas europaea* e a concentração de NPAg.



Através da equação indicada na Figura 10, foi encontrado um KI50 de 0,85 mg Ag_NPAg.L⁻¹, semelhante ao encontrado por Yuan e colaboradores (2013) (0,91 mg Ag_NPAg.L⁻¹). Os autores testaram 3

diferentes NPAg e também detectaram a inibição da nitrificação pela produção de nitrito, constataram redução de aproximadamente 90% na oxidação da amônia para uma concentração de aproximadamente 1 mgAg_NPAg.L⁻¹ (diâmetro aproximado de 6 nm). Neste estudo não foi avaliada esta concentração, entretanto, para 0,75 mgAg_NPAg.L⁻¹ a inibição foi de 42,64%. Como a inibição em cultura pura segue ajuste linear para as concentrações testadas aqui (Figura 10), para a concentração avaliada por Yuan e colaboradores (2013) não atingiríamos tal inibição. Isso pode ser atribuído ao tamanho da partícula (utilizamos NPAg com aproximadamente 35 nm) que é conhecidamente um dos fatores que fazem com que a NPAg tenha maior ou menor capacidade de inibir a atividade bacteriana (CHOI e HU, 2008).

Estes dois gráficos (Figura 9 e Figura 10) indicam que os íons de prata, mesmo em baixas concentrações são mais tóxicos que a nanopartícula por si só, sendo que em nenhum momento houve a formação de nitrito. Foi possível observar também que, nessas condições, há uma inibição transitória e há uma adaptação da cultura à presença do composto tóxico, recuperando a sua atividade, sendo que no quinto dia praticamente não havia mais inibição em relação à produção de nitrito (Figura 9). Radniecki e colaboradores (2011), também verificaram a inibição da mesma cultura em 3 horas de exposição, porém, após um procedimento de lavagem, buscando remover toda NPAg presente, não foi observado retorno da atividade nitritante.

Recuperação do sistema nitrificante após a exposição aos compostos tóxicos foi citada na literatura em culturas mistas, em testes em reatores em escala de bancada. A presença de fluoretos e Cobre (II) em sistemas de tratamento de efluentes indicou um aumento da fase lag nas bactérias oxidadoras de amônia, porém, após aproximadamente 3 dias para fluoretos e 5 dias para o cobre (II), houve recuperação das mesmas. Em ambos os casos os autores atribuem a recuperação a mudanças fisiológicas da comunidade microbiana, ou até mesmo mudança na estrutura da comunidade, ocorrendo um aumento de uma espécie mais resistente ao tóxico em questão (OCHOA-HERRERA et al., 2009, OCHOA-HERRERA et al., 2011).

Liang e colaboradores (2010), utilizando nanopartículas de prata, em cultura mista, observaram que após aproximadamente 10 dias o sistema recuperou a capacidade de oxidar amônia, porém, demorou 25 dias para recuperar parcialmente a atividade respirométrica. Hajipour e colaboradores (2012), citam a existência de bactérias que, como mecanismo de defesa, formam polímeros extracelulares que se ligam às nanopartículas, reduzindo seu impacto. Outras culturas internalizam a

NP ou ainda mudam a expressão de genes, sendo capazes que reparar o DNA danificado.

Fazendo um simples balanço de massa é verificado que uma grande quantidade de nitrogênio não é transformada em nitrito. Sabe-se que o meio contém 50mM de NH_4^+ ($900 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ou $\sim 700 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$) e que no final da cinética havia aproximadamente $890 \text{ mgNO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ ($\sim 271 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$). A fase lag prolongada com o aumento da concentração de prata pode ser atribuída a queda da atividade enzimática ou ao menor crescimento microbiano em altas doses de prata (ROLFE et al., 2012). Entretanto, após 5 a 7 dias de exposição, a concentração de nitrito atingiu um platô similar em todos os casos. Aproximadamente 39% de amônia adicionada ao ensaio ($\sim 271 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1}$) foi transformada em nitrito. Sabe-se que a oxidação da amônia pode ser reduzida devido a concentrações elevadas de nitrito devido a sua interação com amônia monooxigenase, reduzindo a sua atividade (STEIN e ARP, 1998).

Até o momento não foi encontrado na literatura estudo com o cálculo dessas velocidades de produção de nitrito, durante os vários dias de exposição para cultura pura, não sendo possível comparar os resultados. Mas é possível afirmar que diferentes concentrações de prata influenciam a atividade dessas bactérias, sendo provável que a exposição contínua leve a inibição de sistema nitritante.

5.1.3 Liberação de prata

Juntamente com os ensaios cinéticos onde houve a coleta de dados para a análise de nitrito, foram coletadas amostras para a detectar a liberação de íons de prata no meio, não aderida em bactérias.

A inibição da atividade microbiana pela presença de prata pode ser atribuída tanto aos íons deste metal como à nanopartícula de prata. É sabido que os íons de prata são altamente tóxicos (XIU et al., 2011), deste modo esta análise buscou verificar a relação entre a presença desses íons e a inibição da atividade bacteriana. A Tabela 11 mostra os resultados obtidos após os 7 dias de cultivo.

Tabela 11 Concentração de íons de prata liberados de nanopartículas de prata.

Concentração de NPAg ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Concentração de Ag^+ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Porcentagem de Ag^+ liberada (%)
0,075	Não detectado	Não detectado
0,25	$4,64 \pm 0,075 \times 10^{-3}$	1,86%
0,50	$4,73 \pm 0,095 \times 10^{-3}$	0,95%
0,75	$5,87 \pm 1,11 \times 10^{-3}$	0,78%

Observou-se que a concentração de Ag^+ liberado, para concentrações superiores a $0,25 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$, foi em torno de $5 \times 10^3 \text{ mg.L}^{-1}$, não havendo grandes variações. Para verificar se esse valor era o máximo que poderia ser liberado das nanopartículas, ou seja, se $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ era a concentração de saturação de íons de prata para esta solução, foi realizado um teste com a concentração máxima e mínima de NPAg, somente com o meio e com a prata, sem a presença de bactérias. Observou-se que para a concentração de $0,075 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$ foram liberados $12,23 \times 10^{-3} \text{ mgAg}^+.\text{L}^{-1}$ (16,3%) e para $0,75 \text{ Ag_NPAg.L}^{-1}$, $76,15 \times 10^{-3} \text{ mgAg}^+.\text{L}^{-1}$ (10,2%), indicando que não há saturação nestas condições. É interessante citar que não foi detectado a liberação do íon em água ultrapura, portanto a liberação está atrelada, entre outros fatores, à composição do meio.

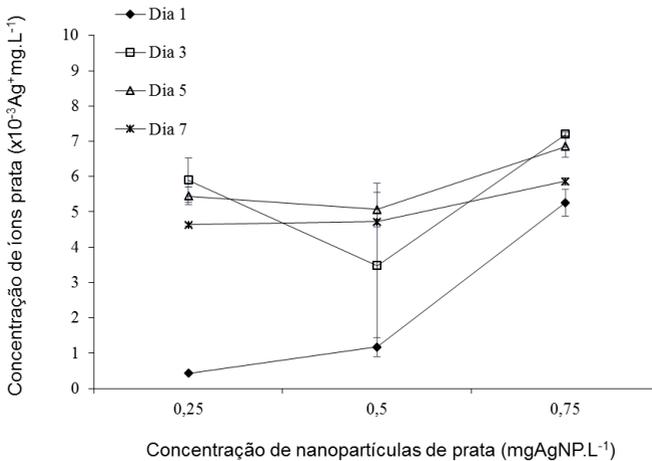
Assim, os dados indicam que a prata estava ligada eletrostaticamente à superfície da bactéria, podendo causar danos a bactéria, reduzindo sua atividade (MATSUMURA et al., 2003). Morones e colaboradores (2005) testaram diversos tamanhos de NPAg na presença de bactérias gram-negativas e através de análises de microscopia eletrônica, NPAg aderidas na membrana das bactérias. Além disso, a superfície da bactéria possui carga negativa e também pode atrair os íons de prata (positivos) para sua superfície (XIU et al., 2011). Assim, a concentração de íons na presença de *N. europaea* será reduzida, pois estes, assim como a NPAg, poderão estar aderidos na superfície da mesma. O íon possui afinidade aos grupos tiol presentes na membrana celular, o que pode resultar numa redução da concentração de Ag^+ no meio (RADNIECKI et al., 2011). Uma digestão em meio ácido pode liberar os íons das bactérias, podendo assim, detectar uma concentração maior do íon.

Radniecki e colaboradores (2011) observaram o efeito tóxico dos íons de prata liberados de NPAg sobre a mesma bactéria pesquisada aqui. Os autores verificaram que quanto maior o tamanho da nanopartícula, menor a concentração de prata liberada (30% para NPAg de 20 nm e 5% para NPAg de 80nm).

A Figura 11 apresenta a variação da concentração desse íon ao longo do tempo, para as diferentes concentrações de nanopartículas testadas. A quantidade de íons liberados do ensaio contendo $0,075 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$ ficaram abaixo do limite de detecção do equipamento. Observa-se que o dia 3 apresenta, em geral, concentração de íon de prata superior ao encontrado no sétimo dia. Esse fato pode ter ocorrido, pois, à medida que o íon é liberado na prata, ele pode ir se ligando tanto a bactéria quanto aos sais presentes no meio. Se Ag^+ se ligar aos sais, tais

como sulfatos, cloretos e fosfatos presentes no meio, a sua biodisponibilidade será menor. (Wang et al., 2003). Entretanto, em nenhum momento a concentração de íons de prata chega ser superior que a concentração mínima inibitória descrita na literatura, $25 \times 10^{-3} \text{ mg Ag}^+ \text{ AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, sendo assim podemos atribuir a inibição aqui encontrada à nanopartícula de prata que tem sua concentração mínima inibitória de $0,5 \text{ mgAg_NPAg} \cdot \text{L}^{-1}$ (YANG et al., 2013a).

Figura 11 Variação da concentração do íon de prata liberado para o meio, ao longo do tempo, para diferentes concentrações de NPAg, em cultivos contendo *N. europaea*. As barras indicam o desvio padrão.

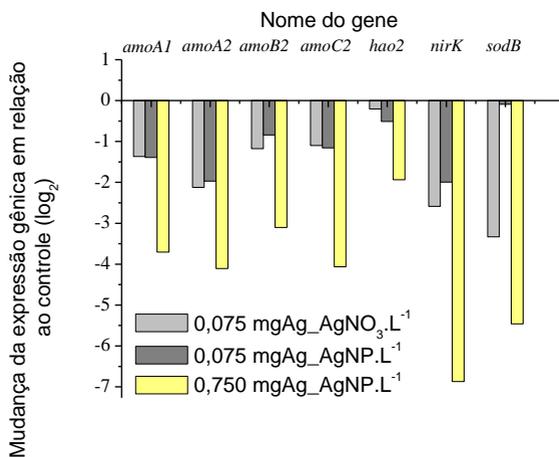


Ao confrontar os dados de liberação de íons com a produção de nitrito, observa-se que a maior diferença entre os pontos, relativa à produção de nitrito, está no terceiro dia (Figura 9). Neste dia, a concentração de Ag^+ foi maior que os demais, com exceção do ponto $0,5 \text{ mgAg_NPAg} \cdot \text{L}^{-1}$ que possui uma grande variação associada a ele. Assim, pode-se supor que neste momento, pode ter havido maior inibição da cultura, já que muitos estudos apontam o íon como o verdadeiro agente tóxico. Entretanto, a concentração aqui testada não foi suficiente para inibir definitivamente a *Nitrosomonas europaea*. Além disso, pode-se inferir também que a partir deste dia (dia 3) houve maior absorção do íon pela bactéria, pois a concentração foi menor nos demais dias.

5.1.4 Efeito da Nanopartícula de Prata e do Íon de prata na expressão gênica

O efeito da exposição da bactéria *N. europaea* a diferentes concentrações de nanopartícula de prata (0,075 e 0,75 mgAg_NP_{Ag}L⁻¹) e ao íon de prata (0,075 mgAg⁺_AgNO₃L⁻¹) está apresentado na Figura 12. Essas concentrações foram escolhidas, pois representam a mínima e a máxima inibição estudada para NP_{Ag}, a concentração do íon foi escolhida para efeitos comparativos. Para interpretar essa figura deve-se considerar que onde as “barras” estão entre o “+1” e o “-1” a expressão daquele gene não sofreu modificações significativas quando a bactéria foi exposta a condição experimentada (LIVAK e SCHMITTEN, 2001). Quando as “barras” estão fora desses limites, acima ou abaixo de ±1, diz-se que a expressão daquele gene foi reprimida (negativa) ou então estimulada (positiva), reduzindo ou aumentando, respectivamente, a velocidade da reação em que as enzimas codificadas por esses genes catalisam.

Figura 12 Expressão dos genes funcionais da *Nitrosomonas europaea* após a exposição ao íon de prata e duas concentrações de NP_{Ag}.



Deste modo, interpretando a Figura 12 e comparando-a com a Figura 4 (página 43), pode-se observar o comportamento bacteriano pela expressão dos genes. Supõe-se que a formação de hidroxilamina, um intermediário da reação de nitrificação é mais influenciada pela presença de concentrações mais elevadas de NP_{Ag}, pois, as subunidades do gene

amo foram mais reprimidos que o *hao2*. Isso sugere que a oxidação da amônia até hidroxilamina será mais lenta do que a oxidação do hidroxilamina ao nitrito ou óxido nítrico (NO). Isso ocorreria principalmente para a concentração de $0,75 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$, onde a expressão desses genes foi mais reprimida que quando expostos à $0,075 \text{ mg.L}^{-1}$ de NPAg e AgNO_3 . Esta condição pode ocasionar uma produção de NH_2OH lenta ($0,75 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$), acumulando amônia. Corroborando com a produção de nitrito, quando a bactéria foi exposta a $0,75 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$ e a fase lag foi maior que nas demais situações (Figura 9, página 79). Lembrando que para este ensaio as bactérias foram expostas por 24 horas, logo não é possível perceber a possível modificação da expressão dos genes após 5 dias de exposição, por exemplo. A expressão desse gene (*amoABC*) pode justificar parcialmente a não formação de nitrito na presença dos íons de prata, entretanto a inibição na expressão deste gene foi menor do que na exposição à $0,75 \text{ mg Ag_NPAg.L}^{-1}$. Portanto outro mecanismo inibitório pode estar ocorrendo não indicado pelos genes aqui estudados. Estudos reportaram que Ag^+ podem se ligar a compostos contendo enxofre e fósforo (DNA e proteínas, por exemplo) fazendo com que a bactéria seja incapaz de se reproduzir de forma apropriada, por exemplo (FENG et al., 2000; WIJNHOFEN et al., 2009; RADNIECKI et al., 2011). A repressão dos genes amônia monooxigenase também foram observados durante a exposição a outros metais pesados como o níquel, indicando a alta suscetibilidade desse grupo de bactérias (BOA) aos compostos tóxicos (Yeung et al., 2013).

Yuan e colaboradores (2013) verificaram a repressão desses genes quando a mesma bactéria foi exposta a concentrações elevadas de NPAg (1000 mg.L^{-1}). Yang e colaboradores (2013a) também encontraram que a oxidação da amônia é mais afetada pela presença de prata do que a formação de nitrito pela redução da hidroxilamina. No entanto, as concentrações pesquisadas por esses autores (YANG et al., 2013a) foram subletais ($2,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) e a oxidação da amônia foi estimulada, ao invés de reprimida, indicando um comportamento de defesa perante a presença de um agente tóxico, aumentando a respiração, produzindo mais energia para reparar algum dano que possa ter ocorrido.

O gene *sodB* codifica a enzima superóxido dismutase que é induzida na presença de radical superóxido e espécies reativas de oxigênio intracelulares (ALQUÉRES et al., 2010). Este foi reprimido para $0,075 \text{ mgAg}^+_{\text{AgNO}_3}.\text{L}^{-1}$ e $0,75 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$.

A expressão do gene *nirK* está ligada à formação de óxido nítrico (NO), que é um precursor para a formação de N₂O, um conhecido gás de efeito estufa. Sua expressão foi determinada para identificar se havia possibilidade de formação desse gás (óxido nitroso) na presença de íon e nanopartícula de prata, uma vez que esse gás pode ser emitido durante a nitrificação em situações de estresse (KOOL et al., 2011; HOOPER e TERRY, 1979). Como a sua expressão foi reprimida nos casos com 0,075 mgAg.L⁻¹ e 0,75 mgAg_NPAg.L⁻¹, não é possível afirmar que há possibilidade de formação de gases de efeito estufa na presença desse tóxico nessas condições. Todavia, o gene *hao2* não foi susceptível a presença de 0,075 mgAg_NPAg.L⁻¹, indicando que a formação de NO por esta rota metabólica ainda é possível, sendo necessário futuras investigações. De acordo com o balanço de massa calculado anteriormente, nem todo nitrogênio adicionado foi recuperado na forma de nitrito. Deste modo, existe a possibilidade que parte desse N tenha sido direcionado para a formação de óxido nítrico e nitroso. Pois, a formação de hidroxilamina não foi completamente inibida e pode haver formação de NO, através da ação da enzima hidroxilamina oxidoreductase e, em seguida formação da N₂O, pela ação de óxido nítrico reductase (Figura 4).

Aqui, todos os genes pesquisados tiveram suas expressões reprimidas, mas isso não significa que a função que eles exercem não esteja ocorrendo. Significa apenas que ocorre de forma mais lenta. Esta análise se mostra como um indicativo do que está acontecendo no metabolismo na bactéria. Entretanto para vincular a esta análise ao que ocorre em sistemas naturais de nitrificação ou mesmo em plantas de tratamento de efluentes, é necessário averiguar esses dados com dados cinéticos.

5.2 CULTURA MISTA

A seguir serão discutidos os resultados obtidos nos ensaios com cultura mista, realizados no Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos, localizado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, na UFSC.

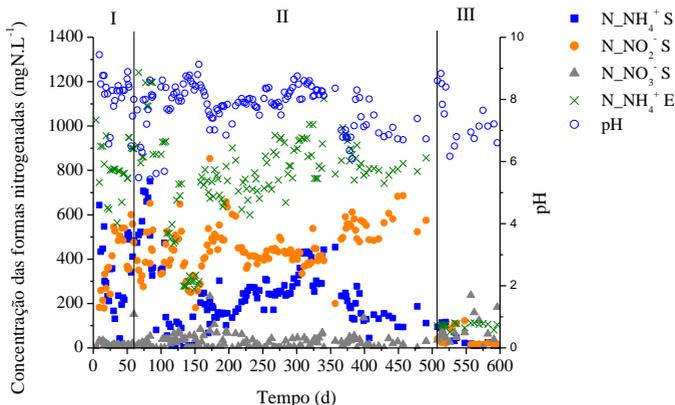
5.2.1 Estabelecimento de um reator enriquecido em biomassa nitritante

O reator foi operado com objetivo de enriquecer e produzir biomassa nitritante para os demais ensaios. O mesmo foi operado durante 617 dias, onde a estratégia de alimentação se mostrou eficiente

para que as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) crescessem com maior velocidade que as bactérias oxidadoras de nitrito (BON) e, conseqüentemente, a formação de nitrito foi maior que a de nitrato.

A Figura 13 indica os dados obtidos durante todo o monitoramento. As fases I, II e III indicam momentos em que houveram as maiores modificações durante a operação desse reator. Na Fase I (dia 1 ao dia 60 de operação) houve duas modificações. No dia 50, o reator “A” foi substituído pelo reator “B”, havendo durante 10 dias uma progressão gradativa do volume, de 1,5 L para 8 L. Após isso, no dia 60, iniciou-se a introdução da alimentação adaptada para os ensaios aqui realizados, onde até o dia 59 utilizava-se o meio Campos sem modificações (CAMPOS et al., 1999). Após esse período, o meio foi substituído pelo descrito na Tabela 4 (página 64) e Tabela 5 (página 65), visando reduzir a concentração de íons que poderiam se ligar aos íons de prata.

Figura 13 Concentração das formas nitrogenadas ao longo da operação do reator para enriquecimento em BOA. Fase I – mudança de meio; fase II – operação do reator com aproximadamente $700 \text{ mg N_NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ e fase III – redução de carga do reator ($100 \text{ mg N_NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$). Onde $\text{N_NH}_4^+ \text{S}$ – concentração de íon amônio na saída do reator; $\text{N_NH}_4^+ \text{E}$ – concentração de íon amônio na entrada do reator; $\text{N_NO}_2^- \text{S}$ – concentração de nitrito na saída do reator; $\text{N_NO}_3^- \text{S}$ – concentração de nitrato na saída do reator.



O regime de operação do reator estabelecido (3 ciclos de 8 horas, com aeração intermitente em períodos com 15 minutos aerados e 45 minutos sem aeração, onde a alimentação foi adicionada durante todos os períodos aerados) foi suficiente para que houvesse limitação de oxigênio, que favorece as BOA. A alimentação feita desta maneira, não

permitiu grandes variações do pH durante o ciclo. Durante toda a operação a concentração de íon amônio no efluente do reator ficou relativamente alta ($\sim 230 \text{ mg N_NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$), isso contribuiu para a inibição das BON. Esta condição, juntamente com o pH maior que 7,5, colabora para a formação de amônia livre que inibe a atividade dessas bactérias.

A concentração de oxigênio dissolvido durante os períodos aerados esteve em torno de $3 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ e, ao desligar a aeração, ficava próximo de zero, limitando a disponibilidade de oxigênio, o que favorece as BOA.

A amônia sempre está de forma residual no final de cada ciclo, devido a sua adição durante o último período aerado, não havendo uma oxidação total da mesma. Em média, durante toda a operação do reator, houve oxidação de mais de 55% de amônia até nitrito.

No início da fase II, a concentração de amônia da alimentação foi aumentada de 800 para $1200 \text{ mg N_NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, porém, o reator se mostrou instável e a concentração foi reduzida novamente. Quanto a adaptação da biomassa nitritante, ela se mostrou rápida. Na fase I foi possível ver o aumento da concentração de nitrito até a sua estabilização. Já, o nitrato foi formado em quantidades muito menores, mostrando que a estratégia de alimentação adotada foi eficiente. No início da fase II observou-se uma variação considerável na produção de nitrito e no consumo de amônia, devido, provavelmente a mudança de meio. Diferentemente dos reatores operados com o meio tradicional proposto por Campos e colaboradores (1999) a biomassa não apresentou a mesma rapidez de adaptação. Bressan (2012) apresentou resultados satisfatórios, com a mesma forma de aeração em 60 dias, porém com outro meio nutritivo.

Outra característica desse reator, diferente dos demais nitritantes operados no laboratório, é que a biomassa nunca apresentou a coloração alaranjada normalmente obtida pelo enriquecimento das BOA (culturas puras de *Nitrosomonas europaea* apresentam essa coloração), indicando que o meio utilizado influenciou na seleção das mesmas.

Demais variações ocorridas durante a fase II e III de operação foram devido a retirada de biomassa para os ensaios que serão discutidos a seguir.

Logo antes do início da fase III de operação (dia 508) houve uma grande retirada de biomassa do reator, reduzindo de forma expressiva a concentração da mesma. Para que o reator recuperasse a sua biomassa, sem sofrer inibição pelo excesso de amônia, foi reduzida a concentração de amônia na alimentação para aproximadamente $100 \text{ mg N_NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$.

Durante a maior parte da operação do reator pode-se dizer que foi possível obter uma biomassa estável e enriquecida em bactérias oxidadoras de amônia, devido ao longo período de operação do reator em condições para enriquecimento das mesmas. Deste modo, obteve-se uma cultura nitrificante necessária para os ensaios realizados. Somente na fase III, onde foi retirada quase 80% do volume do reator para um experimento é que não foi possível adaptar novamente o reator.

5.2.2 Caracterização da nanopartícula de prata

Para os ensaios de cultura mista a nanopartícula de prata foi adquirida do mesmo fornecedor das nanopartículas utilizadas nos ensaios de cultura pura. Porém, como foi um lote diferente, a caracterização da mesma se fez necessária.

A compreensão sobre as características físico-químicas das nanopartículas (NP) é fundamental para um estudo toxicológico, uma vez que isso pode afetar a maneira com que elas agem sobre um determinado grupo de microrganismos.

5.2.2.1 Determinação do potencial zeta

É uma grandeza que pode ser usada para compreender o impacto ambiental e na saúde humana que as nanopartículas podem causar (MONTEIRO-RIVIERE e TRAN, 2007; e ZHANG et al., 2008), uma vez que ele indica se o composto em estudo tem estabilidade eletrostática suficiente para manter a sua estabilidade. Sua medição é necessária para este tipo de nanopartícula para podermos compreender alguns mecanismos de ação dessas NP_{Ag} sobre bactérias.

O potencial zeta uma propriedade física que mede a estabilidade do sistema coloidal. Sabe-se também que para uma partícula não formar aglomerados, ou seja, para que ela seja estável, o valor do potencial deve ser maior que +30 mV ou menor que -30 mV (ALVAREZ-PUEBLA et al., 2005). Quanto mais próximo de zero, menor sua estabilidade.

O pH é um fator importante, que influencia essa medida, pois a presença de íons OH⁻ ou H⁺ influenciará no potencial da mesma. Se o potencial for negativo, por exemplo, a adicionarmos ácido, este potencial irá mudar até que fique positivo, caso a concentração de H⁺ seja elevada (MENON e GUPTA, 1999; GUINGAB et al., 2007).

No presente trabalho o valor medido foi de $-26,1 \pm 0,65$ mV, valor semelhante ao encontrado por Arnout e colaboradores, 2012 ($-23,0 \pm 1.1$ mV). Porém, ele foi medido disperso em água ultrapura. Mesmo

assim, sempre antes de qualquer ensaio utilizando essa NPAg, a solução era mantida em banho de ultrassom por 20 minutos. No caso da nanopartícula utilizada para a cultura pura, o potencial zeta ficou em $-34,10 \pm 0,57$ mV.

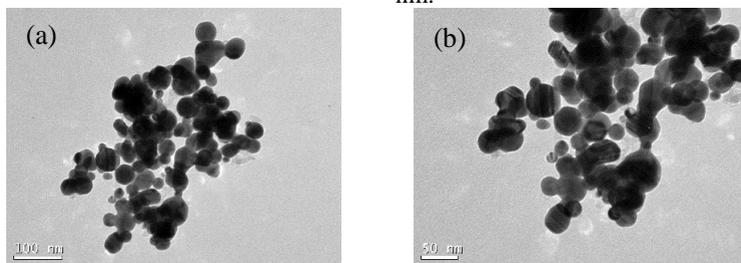
O pH do meio nutritivo utilizado foi mantido acima de 7,5. Quanto maior a concentração de OH⁻ no meio, mais negativo ele será, o que poderá contribuir para a dissipação das nanopartículas aqui testadas no meio líquido.

5.2.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada com o objetivo de verificar a morfologia e o tamanho das nanopartículas de prata utilizadas.

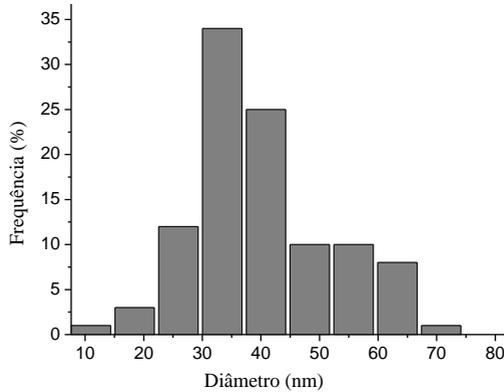
A Figura 14 mostra as imagens obtidas em duas escalas. Ela mostra que as nanopartículas possuem em geral, um formato esférico. Elas não estão dispersas como é comum verificar em imagens de nanopartículas produzidas em escala laboratorial, utilizando citrato, por exemplo. Um dos motivos pode ser o potencial zeta, que já indica uma certa tendência a formação de aglomerados Lu e colaboradores (2010) indicaram que nanopartículas de prata, quando secas, podem ser oxidadas pelo ar, podendo formar óxidos de prata.

Figura 14 Imagens da nanopartícula de prata obtidas através do MET. (a) Microfotografia com escala de 100 nm; (b) microfotografia com escala de 50 nm.



Com estas e outras imagens (não mostradas aqui) fornecidas pelo MET foi possível montar um histograma com a distribuição de tamanho das NPAg (Figura 15), indicando que 34 % das nanopartículas possuem diâmetro de aproximadamente 33 nm, 25 % possuem diâmetro de aproximadamente 40 nm. Em média, os valores ficaram em 44,61 nm.

Figura 15 Distribuição de tamanho das nanopartículas.



Os valores aqui encontrados ficaram acima do especificado pelo fabricante, que diz em seu laudo que as partículas teriam um tamanho uniforme de 25 nm.

5.2.3 Inibição em processo em batelada sobre a comunidade nitrificante enriquecida

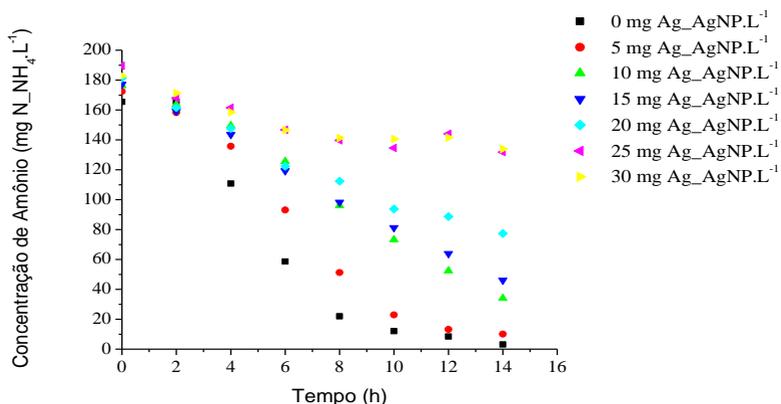
Para estes testes utilizou-se a biomassa enriquecida em bactérias oxidadoras de amônia, cultivada no reator “B”, em agitação orbital (shaker), com diferentes concentrações de nanopartículas de prata e, separadamente, íons de prata. Ambos os testes serão discutidos a seguir.

Antes da realização destes ensaios, foi feito um teste abiótico, com as mesmas concentrações de NPAg e Ag^+ , visando verificar se a prata causaria alguma interferência no pH ou no oxigênio dissolvido ao longo dos experimentos. Os dados obtidos mostraram que essas grandezas não são influenciadas pela prata e não sofreram modificações significativas ao longo do tempo (Vide Anexo 9.1, página 145).

5.2.3.1 Inibição em processo em batelada de nanopartícula de prata sobre as bactérias oxidadoras de amônia

Para este ensaio, as diferentes concentrações de nanopartículas de prata testadas apresentaram diferentes níveis de inibição. A Figura 16 mostra o consumo de amônia ao longo das 14 horas de reação. É nítida a redução deste consumo a medida que a concentração de nanopartículas de prata aumenta.

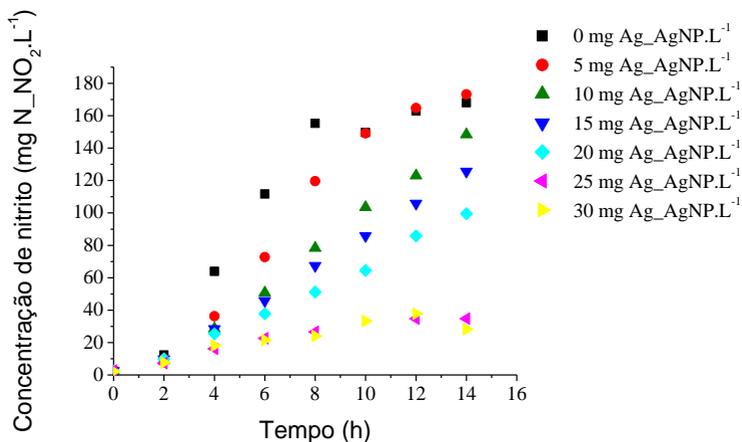
Figura 16 Consumo de amônio pelas BOA em função do tempo, em diferentes concentrações de NPAg.



Este resultado apenas demonstra a tendência de inibição da atividade das BOA. Não foi utilizado para o cálculo de porcentagem de inibição, pois este resultado pode ser influenciado pelo arraste de amônia em pH acima de 8. Em alguns casos, como com concentrações mais elevadas de NPAg (25 e 30 mg Ag_NPAg.L⁻¹), onde praticamente não houve consumo, o pH se manteve elevado (entre 8,2 e 8,3), podendo comprovar o pequeno consumo mostrado. Esse gráfico indica também, que para o controle, em 10 horas, praticamente toda a amônia já havia sido consumida. Entretanto, o mesmo não foi observado para as concentrações entre 10 e 20 mg Ag_NPAg.L⁻¹, que em 14 horas ainda não haviam consumido tudo. Para as concentrações de 25 e 30 mg Ag_NPAg.L⁻¹ houve um comportamento muito semelhante, indicando que acima de 25 mg Ag_NPAg.L⁻¹ já não há mais atividade nitritante.

A Figura 17 mostra a produção de nitrito durante as 14 horas de ensaio. Pode-se observar que, a maior parte do consumo de íon amônio foi direcionado para a produção de nitrito. Havendo uma diferença considerável na velocidade de produção de nitrito em cada exposição. NPAg

Figura 17 Produção de nitrito durante a exposição da cultura nitritante à NPAg.



Para calcular as velocidades específicas de consumo de nitrito foi considerada a concentração de sólidos suspensos voláteis dentro de cada frasco, que ficou em 0,54, 0,62, 0,54, 0,6, 0,48, 0,52 e 0,62 g SSV.L⁻¹, respectivamente, para os ensaios com 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg Ag_NPAg.L⁻¹. As velocidades específicas encontradas estão na Tabela 12.

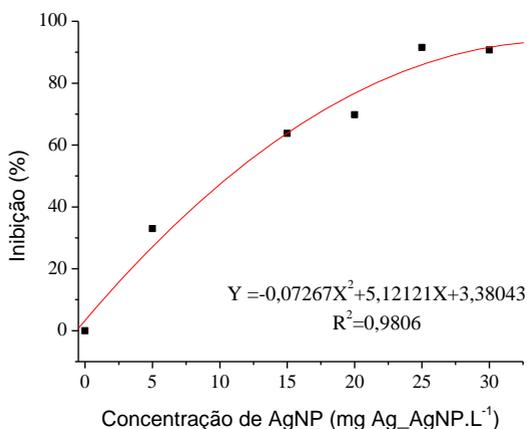
Tabela 12 Velocidades específicas de produção de nitrito nos ensaios de inibição em batelada das BOA com NPAg.

Concentração de Ag_NPAg.L ⁻¹	Velocidade específica de produção de nitrito (mg N_NO ₂ ⁻ .(gSSV.h) ⁻¹)	Inibição (%)
0	45,99	0,00
5	30,83	32,97
10	24,40	46,94
15	16,68	63,74
20	13,90	69,77
25	3,89	91,54
30	4,26	90,73

Foi observado um aumento expressivo na inibição da atividade das bactérias oxidadoras de amônia a medida que a concentração das NPAg também sofre acréscimo. Para a determinação da concentração necessária para inibir 50% da atividade bacteriana (KI50) e relacionar

cada concentração com um índice de inibição, foi plotado um gráfico inibição versus concentração de prata, que foi ajustado com um polinômio de segundo grau (Figura 18).

Figura 18 Correlação entre o grau de inibição da atividade das bactérias e a concentração de NPAg.



Pela equação indicada pela Figura 18, foi encontrado um KI50 de 10,75 mg Ag_NPAg.L⁻¹. Choi e Hu (2008) encontraram inibição de 50% do crescimento de bactérias nitrificantes para a concentração de 0,14 mg NPAg.L⁻¹. Um valor expressivamente menor do que o encontrado aqui. Porém, esses autores utilizaram um método muito mais sensível que mede pequenas variações na respiração celular.

Entretanto, sabe-se que culturas mistas são muito mais complexas e, devido a isso, apresentam uma maior resistência a presença de compostos antimicrobianos. Portanto esse valor é considerado elevado e, provavelmente, não seria encontrado em plantas de tratamento de efluentes. Gue colaboradores. (2014) encontraram inibição de apenas 24,9% na oxidação da amônia quando a cultura presente em lodos ativados foi exposta a 50 mg NPAg.L⁻¹, valor abaixo do encontrado neste estudo. Um dos motivos para isso, é a cultura utilizada nesta pesquisa, enriquecida em BOA, que são conhecidamente mais sensíveis a presença de compostos tóxicos. Os autores atribuíram e redução da atividade à ruptura da membrana celular, causada pelas nanopartículas de prata, com tamanhos superiores a 10 nm, devido penetração física ou reações químicas na superfície da bactéria. Eles não encontraram a formação de espécies reativas de oxigênio.

Porém, outros estudos demonstram que a presença de NPAg pode estimular a formação dessas espécies (CHAIRUANGKITTI et al., 2013) e causar danos a mitocôndria e, também, a membrana. Entretanto esses testes foram realizados em células cancerígenas pulmonares. Em testes com culturas de *Nitrosomonas europaea* não foram encontradas a formação das espécies reativas de oxigênio (YANG et al., 2013a). Já, Choi e Hu, 2008, em uma cultura enriquecida de BOA encontraram espécies reativas de oxigênio e a sua concentração apresentou correlação com o índice de inibição. Porém, é diferente para diferentes formas de prata, mostrando que outros mecanismos podem agir sobre este tipo de bactéria. Choie colaboradores, 2008, observaram inibição maior que 80% para uma cultura nitrificante com apenas 1 mg.L⁻¹ de NPAg. Neste estudo, com 5 mg Ag_NPAg.L⁻¹ o índice de inibição foi de aproximadamente 30%. As nanopartículas utilizadas pelo autor tinham 14 nm de diâmetro e sabe-se que quanto menor o diâmetro, maior a área superficial, maior o efeito inibitório.

Um dos fatores que pode levar à inibição por prata, é a presença de íons de prata (Ag⁺) dissolvidos no meio, que podem ser mais impactantes na atividade celular (XIU et al., 2011). Entretanto, em meios nutritivos complexos (normalmente utilizados para o crescimento de bactérias nitrificantes ou até em sistemas de tratamento de esgotos) há a presença de outros ânions que podem complexar com a prata, como cloretos, sulfetos, tiossulfatos, entre outros (CHOI et al., 2008), minimizando seu efeito. No caso deste estudo, a presença desses ânions foi reduzida, evitando assim, que os Ag⁺, dissolvidos das NPAg, fossem complexados.

A Tabela 13 mostra a concentração de íons encontrados no sobrenadante de cada ensaio. Verificou-se que, até o ensaio com 20 mg Ag_NPAg.L⁻¹ não foi detectada a presença dos íons (ou foi menor que o limite de detecção do equipamento). Acima disso, foi observada a presença dos mesmos. Porém, as concentrações aqui reportadas, com exceção do ensaio com 30 mg Ag_NPAg.L⁻¹, estão abaixo daquelas que estão apresentadas na literatura como mínimas inibitórias (0,025 mg Ag⁺_AgNO₃.L⁻¹, YANG et al., 2013). Mesmo quando a concentração de íons ficou acima da mínima inibitória, o comportamento do consumo de amônia e produção de nitrito foi muito semelhante ao ensaio com 25 mg Ag_NPAg.L⁻¹ (Figura 16 e Figura 17). Portanto, não é possível associar a inibição ocorrida aqui à presença desses íons.

Tabela 13 Concentração de íons de prata liberada da NPAg em cada ensaio.

Ensaio (concentração de Ag_NPAg.L ⁻¹)	Ag (mg.L ⁻¹)*
0	< 0,012
5	< 0,012
10	< 0,012
15	< 0,012
20	< 0,012
25	0,01947 ± 0,0017
30	0,03452 ± 0,0022

* Limite de detecção do equipamento 0,012 mg.L⁻¹

Dados aqui apresentados, como velocidade de formação de nitrito, cálculo da inibição da atividade nitritante e KI50 não são reportados na literatura. Buscando compreender como as nanopartículas podem agir sobre a cultura enriquecida de bactérias oxidadoras de amônia, optou-se por fazer um teste com nitrato de prata (Ag⁺). Este teste foi realizado para avaliar o efeito que apenas os íons podem causar sobre a cultura, uma vez que, há estudos diversos apontando a NPAg como mais tóxica e outros os íons de prata como agente tóxico.

5.2.3.2 Inibição em processo em batelada de íons prata sobre as bactérias oxidadoras de amônia.

Foram utilizadas concentrações menores do que as testadas com NPAg. Pois, a princípio já era esperado maior nível de inibição. A Figura 19 mostra o consumo de amônio ao longo das 14 horas de reação.

Aqui, mais uma vez nota-se que a dose de prata é obviamente associada ao nível inibitório, quanto maior a concentração, menor o consumo de amônio. Assim como no ensaio com NPAg, esses dados não serão usados para o cálculo das velocidades, e sim a produção de nitrito (Figura 20).

Figura 19 Consumo de amônio pelas BOA em função do tempo, em diferentes concentrações de Ag^+ .

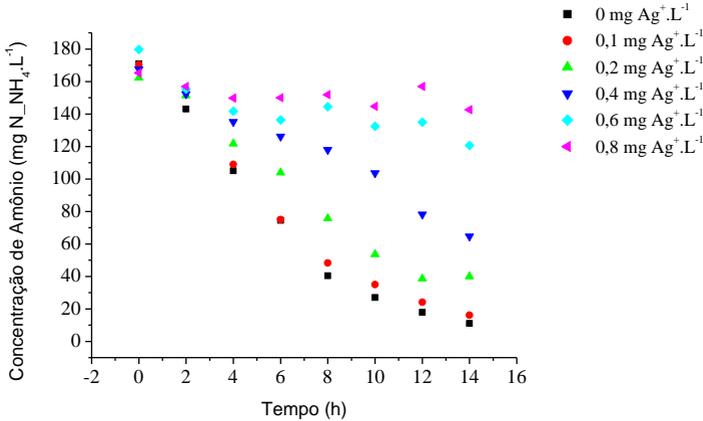
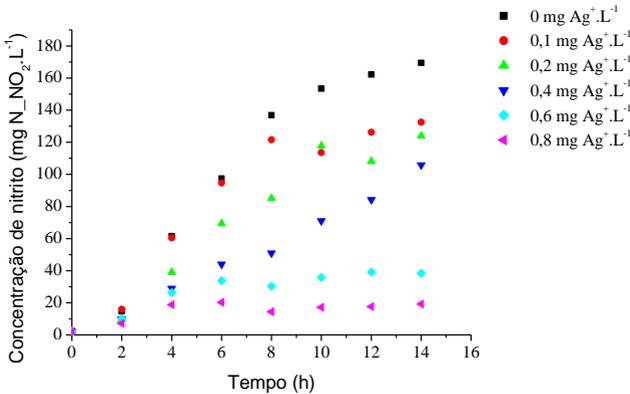


Figura 20 Produção de nitrito durante a exposição da cultura nitritante à Ag^+ .



Observa-se claramente a influência da concentração do íon sobre a produção de nitrito (Figura 20). Com apenas 0,1 mg Ag^+ _AgNO₃.L⁻¹ é possível observar diferença entre a produção de nitrito em relação ao controle, ficando praticamente constante após 8 horas de reação.

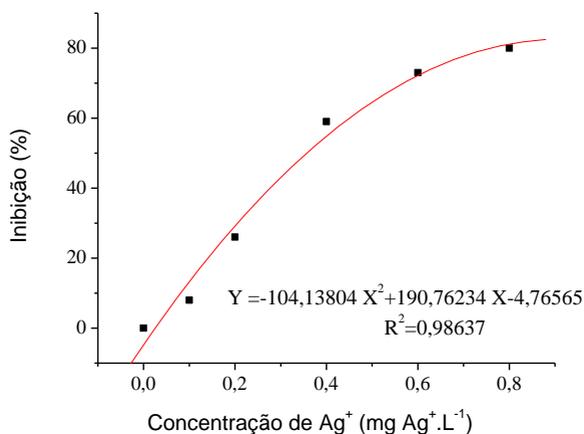
Para a determinação das velocidades específicas (Tabela 14) foi determinada a concentração de sólidos suspensos voláteis. Os valores encontrados foram: 0,51, 0,54, 0,51, 0,54, 0,56 e 0,53 g SSV.L⁻¹, respectivamente, para 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 mg Ag^+ _AgNO₃.L⁻¹.

Tabela 14 Velocidades específicas de produção de nitrito nos ensaios de inibição em processo em batelada das BOA com Ag^+ (AgNO_3).

Concentração de Ag^+ $\text{AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$	Velocidade específica de produção de nitrito ($\text{mg N}_{\text{NO}_2^-} \cdot (\text{gSSV} \cdot \text{h})^{-1}$)	Inibição (%)
0	39,54	0,00%
0,1	36,48	7,73%
0,2	29,36	25,74%
0,4	16,11	59,26%
0,6	10,54	73,35%
0,8	7,85	80,14%

Claro está que a inibição gerada pelo íon de prata, assim como, para a nanopartícula, está relacionada à concentração. Quanto maior a concentração, maior a redução da velocidade de produção. A Figura 21 mostra que a correlação entre inibição e concentração ajustou-se por um polinômio de segundo grau.

Figura 21 Correlação entre o grau de inibição da atividade das bactérias e a concentração de Ag^+ .



Através do ajuste apresentado na Figura 21 foi possível calcular o KI50 (concentração necessária para inibir 50% da atividade bacteriana) para os íons de prata, o qual pode ser observado na concentração de 0,357 $\text{mg Ag}^+ \text{AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Esse valor é 4 vezes maior que o reportado na literatura para culturas puras, que fica em torno de 87 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (YANG et al., 2013a), isso pode ser justificado pela diferença dos

meios utilizados e, também, por ser uma cultura mista, que apresentam outros fatores associados que podem reagir com a prata e reduzir o seu efeito tóxico.

A inibição por íons de prata está ligada a formação de espécies reativas de oxigênio. Choi e Hu (2008) apontaram que a presença de Ag^+ estimula a formação dessas espécies (intracelulares) estão diretamente ligadas à concentração do íon. Autores afirmam que o Ag^+ não causa danos expressivos a membrana celular. Porém, pode se ligar aos constituintes com fósforo e enxofre (proteínas e DNA), impedindo o bom funcionamento da célula (FENG et al., 2000; RADNIECKI et al., 2011). Feng e colaboradores, 2000, verificaram que as moléculas de DNA se tornam condensadas e perdem a sua capacidade de replicação e os íons são capazes de interagir com grupos tiol em proteínas, tornando-as inativas.

5.2.3.3 Comparação entre a inibição em processo em batelada de NPAg e Ag^+

Conforme verificado nos ensaios descritos nos dois itens anteriores, nota-se que no caso deste estudo, o íon mostra-se mais tóxico que a própria nanopartícula. Esse resultado está de acordo com alguns estudos e contrários a outros, mostrando que esta questão do nível inibitório das diferentes formas de prata é dependente de vários fatores.

Choi e colaboradores, (2008) verificaram que as nanopartículas de prata (diâmetro de 14 nm) reduziram a respiração celular em 86%, já os íons inibiram aproximadamente a metade disso (42%) em bactérias nitrificantes. No mesmo estudo, eles encontraram uma inibição do crescimento em 55% e 100% para NPAg e Ag^+ da *Escherichia coli*, indicando diferentes mecanismos de ação, em diferentes organismos, mesmo que ambos sejam gram-negativos. Os autores utilizaram um meio nutritivo diferenciado, onde a concentração de íons ligantes aos íons foi minimizada, ou seja, os íons adicionados provavelmente estavam livres, sem ligação com constituintes do meio.

Yang e colaboradores, (2014) concluíram que NPAg (diâmetro de 35 nm) podem afetar de forma mais severa a comunidade microbiana oxidadora de amônia comparando com as mesmas partículas com diâmetro de 5 nm e também com os íons de prata. Estes autores verificaram que ocorre uma modificação na estrutura da comunidade nitrificante do lodo ativado, havendo uma redução das bactérias oxidadoras de amônia presentes quando expostas a NPAg (35 nm), o mesmo não foi observado para NPAg de menor tamanho e íons de prata.

Entretanto, eles utilizaram diferentes concentrações das formas de prata utilizadas, sendo a mais concentrada para NPAg com 35 nm (40 mg.L^{-1}), o que pode ter influenciado no resultado. Além disso, os autores utilizaram lodo ativado, sem lavagem, ou seja, o meio continha diversos sais que poderiam complexar os íons de prata. Choi e Hu, 2008, verificaram que quanto menor a NPAg (na mesma concentração), maior o seu efeito inibitório, pois elas podem penetrar na bactéria ou até mesmo aderir a membrana impedindo trocas com o meio, reduzindo ou inibindo completamente a atividade celular.

Em contrapartida, existem outros estudos que indicam que os íons são os grandes responsáveis pelo efeito tóxico, sugerindo que na verdade, em condições aeróbias o íon de prata é liberado na nanopartícula, ficando dissolvido no meio e agindo como verdadeiro agente antimicrobiano, quando não existem compostos capazes de se ligar com ele (XIU et al., 2011). Arnaout e Gunsch, 2011, testando diferentes revestimentos de NPAg, concluíram que aquelas que foram sintetizadas com nitrato e goma arábica liberaram uma quantidade superior de íons em relação as demais partículas testadas. e, nesses casos, a inibição da atividade foi mais significativa. Os mesmos autores verificam um comportamento semelhante ao encontrado aqui, $20 \text{ mg NPAg.L}^{-1}$ teve uma redução de atividade semelhante ao teste com $0,2 \text{ mg Ag}^+.\text{L}^{-1}$, ou seja o íon foi 100 vezes mais tóxico que a NPAg.

No presente estudo $0,8 \text{ mg Ag}^+.\text{AgNO}_3.\text{L}^{-1}$ inibiu 80% da atividade da BOA, entretanto, seria necessário aproximadamente $22 \text{ mg Ag}^+.\text{NPAg}.\text{L}^{-1}$ para apresentar nível semelhante de inibição, ou seja, uma concentração quase 28 vezes maior. Aqui também não houve detecção significativa de íons de prata nos ensaios com nanopartícula, reforçando a hipótese de que os íons causam maior inibição quando presentes. Pensa-se que a nanopartícula pode ter se depositado na superfície das bactérias impedindo as trocas com o meio, reduzindo a atividade conforme a concentração. Para testar esta possibilidade foi feito uma análise por microscopia que será discutida no próximo item.

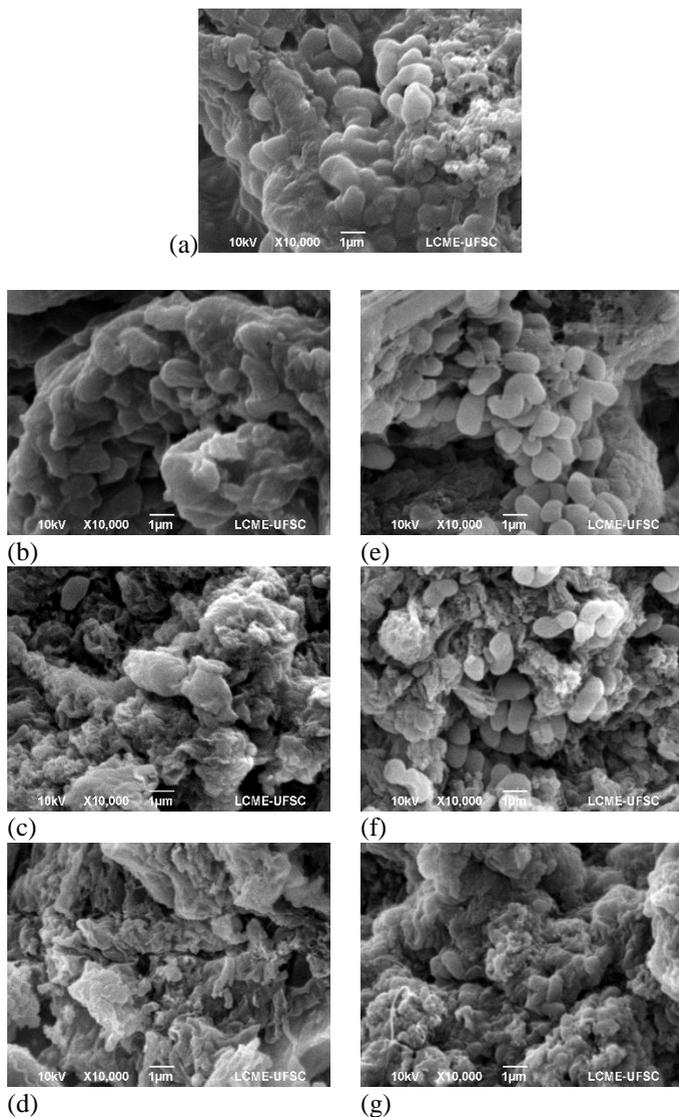
5.2.3.4 Influência de nanopartícula e íons de prata sobre a morfologia da comunidade bacteriana

Uma das maneiras utilizadas para compreender o mecanismo de ação de compostos tóxicos sobre comunidades microbianas é através da utilização de imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura. Após os testes cinéticos discutidos nos itens anteriores, decidiu-se

examinar como as formas de prata estudadas interagem com as bactérias.

A Figura 22 mostra as imagens obtidas no microscópio eletrônico de varredura localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (UFSC). A primeira imagem (a) onde não houve exposição a nenhum tipo de prata (controle). Nela é possível visualizar as formas típicas presentes em sistemas nitrificantes reportados na literatura (TSUNEDA et al., 2003; FERRETTI, 2009). As imagens da Figura 26 (b), (c) e (d) mostram as amostras que foram expostas a 5,00, 10,75 e 30 ,00mgAg_NPAg.L⁻¹, respectivamente. É perceptível que à medida que a concentração de nanopartículas de prata aumenta, mais difícil fica de visualizar as bactérias nas imagens. As NPAg podem aderir-se a membrana celular da bactéria, modificando a permeabilidade da membrana, interferindo na respiração e gerando dissipação da força motriz dos prótons para a geração de ATP, podendo gerar a morte da bactéria (STENSBERG et al., 2011). Jin e colaboradores (2010) afirmam que em bactérias gram-negativas, que possuem lipopolissacarídeos (LPS) na sua membrana, a presença de cátions bivalentes pode auxiliar a formação de uma espécie de ponte entre as NPAg carregadas negativamente e o LPS na superfície da bactéria, mudando a permeabilidade da mesma, facilitando a passagem da NPAg pela membrana, justificando assim, a aderência e presença de NPAg na superfície e no interior da bactéria. Yuan e colaboradores (2013) visualizaram em suas imagens de *Nitrosomonas europaea* tratadas com NPAg por 3 horas e as imagens apresentaram rompimentos e furos na membrana celular, que podem levar à liberação do material celular. Além disso, também puderam perceber a aderência das nanopartículas nas bactérias. Apesar de não ser possível visualizar claramente danos na membrana aqui, à medida que a concentração de NPAg aumenta, não é mais possível observar de forma clara as bactérias, mostrando que as mesmas foram danificadas e podem ter sofrido rompimento. Choi e colaboradores, (2008), verificaram a formação de ruptura na superfície das bactérias estudadas, confirmando que as nanopartículas de prata são capazes de provocar a morte ou redução da atividade bacteriana devido a danos na membrana celular.

Figura 22 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), de amostras de biomassa expostas à (a) 0 mg Ag.L^{-1} (controle); (b) 5 mg Ag_NPAg.L^{-1} ; (c) 10,75 mg Ag_NPAg.L^{-1} ; (d) 30 mg Ag_NPAg.L^{-1} ; (e) 0,1 mg $\text{Ag}^+_{\text{AgNO}_3.L}^{-1}$; (f) 0,357 mg $\text{Ag}^+_{\text{AgNO}_3.L}^{-1}$ e (g) 0,8 mg $\text{Ag}^+_{\text{AgNO}_3.L}^{-1}$.



As imagens da Figura 22 (e), (f) e (g) mostram os ensaios com 0,10, 0,36 e 0,80 mg $\text{Ag}^+_{\text{AgNO}_3} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Nestes casos observa-se maior integridade morfológica da bactéria em todos os casos, apesar do aumento da concentração do íon nos ensaios. A Figura 22(e) parece ter as bactérias de forma mais abundante que o controle, porém, a escolha da área para coletar a imagem influenciou.

Diversos autores já reportaram que, os íons de prata atuam diretamente dentro da bactéria se ligando a compostos com enxofre e fósforo (FENG et al., 2000; WIJNHOFEN et al., 2009; RADNIECKI et al., 2011). Isso faz com que a atividade da mesma seja reduzida, mesmo sem que ocorram modificações na sua membrana. Radniecki e colaboradores (2011) verificaram que em concentrações de íons de prata acima de 0,2 mg $\text{Ag}^+ \cdot \text{L}^{-1}$ a concentração de K^+ intracelular é reduzida, indicando uma liberação desse cátion para o meio, provavelmente, devido a alguma desestabilização da membrana celular. Isso pode ser observado, principalmente, na Figura 22(g), onde a presença de formas semelhantes às bactérias do controle é bem menor.

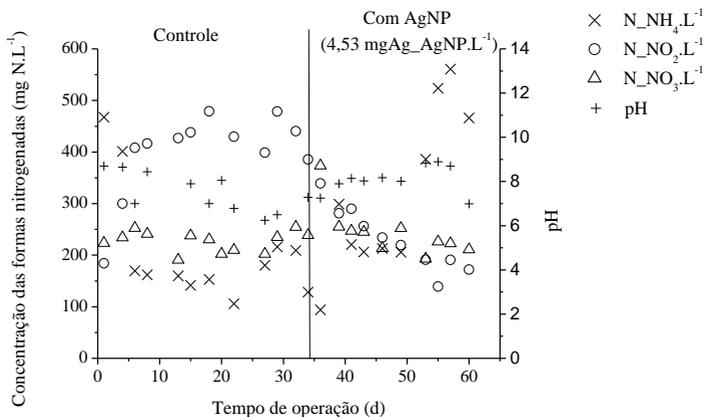
Dessa forma, observa-se que um dos mecanismos de ação das NP_{Ag} é a adsorção na superfície da bactéria, impedindo as trocas com o meio e, também, a ruptura da mesma. Já os íons atuam, provavelmente, com mais eficácia na parte interna, prejudicando o bom funcionamento das funções celulares, e também, estando associado a produção de espécies reativas de oxigênio, pode provocar algum dano a membrana, causando a morte das mesmas. Claro está que essas não são as únicas formas de ação, porém, elucidam alguns mecanismos de toxicidade.

5.2.4 Inibição em processo contínuo da nanopartícula de prata sobre a cultura de bactérias nitrificantes

A fim de verificar a tolerância da comunidade bacteriana oxidadora de amônia durante um período mais longo de exposição, optou-se por fazer testes de inibição em processo contínuo (4.5.1.7, página 70). Após o reator ter sido inoculado, foi aguardado que o mesmo entrasse em estado estacionário. A Figura 23 mostra os dados do efluente deste reator, sendo que ele foi alimentado com, em média, 700 mg $\text{N}_{\text{NH}_4^+} \cdot \text{L}^{-1}$, assim como no reator B, que serviu de fonte de biomassa para este experimento. Até o dia 33 o reator foi operado sem a presença de NP_{Ag}, buscando a estabilidade do sistema. A partir do dia 34 adicionou-se nanopartículas de prata na alimentação, para que a concentração ficasse em torno de 4,53 mg $\text{Ag}_{\text{NPAg}} \cdot \text{L}^{-1}$, referente a

aproximadamente 25% de inibição durante os ensaios de inibição em processo em batelada.

Figura 23 Monitoramento das formas nitrogenadas no efluente do reator durante o ensaio de inibição em processo contínuo controle (sem prata) e com NPAg (4,53 mgAg_{NP}Ag.L⁻¹).



A concentração de nitrato na saída do efluente do reator se manteve elevada, acima de 200 mg N₂NO₃⁻.L⁻¹, pois, ele foi adicionado juntamente com os sais de alimentação (vide Tabela 4, página 64 e Tabela 5, página 65). Observou-se que o reator, após um curto período de tempo, apresentou estabilidade na fase controle, com menos de 10 dias já estava operado de forma adequada. Após a adição de NPAg foi constatado que o pH aumentou, indicando a redução da oxidação da amônia, na nitrificação, processo que acidifica o meio. Após o segundo dia com prata, a concentração de amônia no efluente do reator aumentou consideravelmente, passando de aproximadamente 100 mgN₂NH₄⁺.L⁻¹ para valores acima de 300 mgN₂NH₄⁺.L⁻¹, subindo gradativamente. Claro que, acompanhado deste aumento, houve o decréscimo na concentração de nitrito, que iniciou no período de inibição em processo contínuo, ou seja, quando iniciou-se a adição de NPAg, com um acúmulo de aproximadamente 340 mgN₂NO₂⁻.L⁻¹ e, ao final, havia aproximadamente a metade desse valor. A operação do reator foi mantida por mais alguns dias além do último dado apresentado no gráfico (Figura 23). Todavia não foi apresentado aqui, pois, o comportamento permaneceu o mesmo, não havendo adaptação da biomassa para esta concentração de NPAg, o reator perdeu a sua

operacionalidade. Em estudo recente, Ma e colaboradores (2015) não observaram influência de 20 mg NPAg.L⁻¹ (diâmetro de 52 nm) na nitrificação, contrariando os resultados obtidos aqui. Porém, eles utilizaram lodo ativado sem aclimatação, diferente da biomassa estudada aqui, que foi enriquecida em uma cultura nitritante, conhecida por sua maior sensibilidade à presença de compostos tóxicos. Isso indica que, reatores exclusivamente nitritantes sofrem maior impacto em sua atividade que um sistema convencional de lodos ativados. Por outro lado, Quan e colaboradores (2015) observaram uma queda representativa da atividade nitrificante (33%) após 35 dias de exposição (5 mg NPAg.L⁻¹), concordando com os dados obtidos aqui.

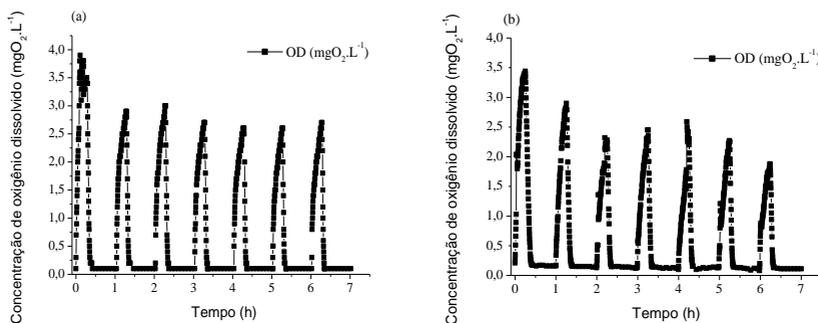
Se compararmos a inibição obtida aqui com aquela vista na nos ensaios de inibição em processo em batelada, é possível observar que quando a comunidade bacteriana é exposta por curto período de tempo, a inibição pode ser subestimada. No caso da inibição em batelada, a concentração de aproximadamente 5 mg Ag_NPAg.L⁻¹ apresentou uma inibição de aproximadamente 30% na velocidade de produção de nitrito e praticamente toda a amônia adicionada foi oxidada (restando apenas 5,84% do que foi adicionado). Aqui, numa concentração menor do que essa, o consumo de amônia foi sendo reduzido a medida que os dias de operação avançavam. No ensaio controle, aproximadamente 55 % de amônia adicionada foi convertida a nitrito (considerado os dias do período com maior estabilidade). Já na etapa com NPAg, esse valor reduziu para em torno de 23% nos últimos dias de operação, gerando um acúmulo de amônio no reator. A concentração de amônia no efluente do mesmo, ficou em torno de 500 mg N_NH₄⁺.L⁻¹, valor que se convertido para amônia livre (considerando um pH médio de 8,2 e temperatura de 32°C) fica em 64 mg N_NH₃.L⁻¹. Sabe-se que a amônia livre é tóxica para bactérias nitritantes, havendo inibição com concentração acima de 10 mg NH₃.L⁻¹ (SCHMIDELL e REGINATTO, 2007). Deste modo, durante a inibição em processo contínuo é possível observar que a redução da atividade das BOA causada pela adição contínua de NPAg, reduz a atividade das bactérias pelos mecanismos já citados. E, esta inibição, gera acúmulo de amônia livre, que por sua vez, também causa redução da atividade bacteriana, havendo a longo prazo colapso do sistema nitritante, fato que não pode ser observado em ensaios de inibição em processo em batelada.

Visando verificar a influência da NPAg sobre o consumo de oxigênio e o comportamento do consumo de substrato, foi observado o ciclo de cada etapa (7 horas de reação), em um determinado dia de operação. Para a etapa controle, a concentração de sólidos suspensos

voláteis estava em $0,385 \text{ g SSV.L}^{-1}$ e, para o período com $4,53 \text{ mg Ag_NPAg.L}^{-1}$ a concentração diminuiu para $0,260 \text{ g SSV.L}^{-1}$. As concentrações de amônia, nitrito e nitrato mantiveram-se aproximadamente constantes ao longo de todo ciclo. Pois, ao mesmo tempo em que ocorre o consumo de substrato, ele é adicionado, havendo também acúmulo de amônia. Assim como o nitrito, que é produzido em pequenas quantidades durante os períodos aerados, e ao mesmo tempo é diluído pela adição de meio nutritivo no reator. O pH ficou em torno de 7,21 durante todo o ciclo controle e 7,90 para o ciclo com prata.

O consumo de oxigênio também teve valores próximos entre cada queda de oxigênio, no fim de cada período aerado. A Figura 24a indica a variação de oxigênio dissolvido no meio, enquanto, o reator estava sendo operado sem nanopartículas de prata. Verificou-se que, apesar do primeiro pico ser maior que os demais (devido a presença de uma bolha no oxímetro) a queda da concentração de oxigênio é semelhante em cada etapa. Na segunda imagem (Figura 24b) está o perfil de oxigênio dissolvido (OD) após a adição de nanopartículas. Onde, os valores máximos atingidos em cada pico ficaram semelhantes ao controle.

Figura 24 Variação da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do ciclo de operação, durante a etapa controle (a) e após a adição de NPAg (b) ($4,53 \text{ mg Ag_NPAg.L}^{-1}$).



A partir dos dados demonstrados nesses dois gráficos, calculou-se as velocidades específicas de consumo de oxigênio (QO2) para cada período aerado. E, no final, foi calculada a média (Tabela 14). Sendo que para o cálculo de cada velocidade foi considerada a reta com maior inclinação entre os dados obtidos após o desligamento da aeração. A concentração de SSV utilizada para os cálculos foi de $0,385 \text{ g SSV.L}^{-1}$

(controle) e 0,260 g SSV.L⁻¹, para o controle e exposto à NPAg, respectivamente.

Tabela 15 Velocidades específicas de consumo de oxigênio antes e após a adição de NPAg (4,53 mg Ag_NPAg.L⁻¹).

Períodos aerados durante o ciclo	QO _{2c} (mgO ₂ .min ⁻¹ .gSSV ⁻¹) (controle)	QO _{2Ag25} (com 4,53 mg Ag_NPAg.L ⁻¹) (mgO ₂ .min ⁻¹ .gSSV ⁻¹)
1°	2,57	1,82
2°	2,73	2,24
3°	2,96	2,18
4°	2,88	2,52
5°	2,92	2,28
6°	3,12	2,24
7°	2,92	1,98
<i>Média</i>	<i>2,87±0,16</i>	<i>2,18±0,21</i>

Quando as médias dessas velocidades são comparadas, tem-se um decréscimo de 24% no QO₂. Mais uma vez, se observado de forma isolada, é possível supor que o reator continuaria a operar, porém, com uma menor eficiência, todavia, isso não aconteceu, conforme explicitado anteriormente.

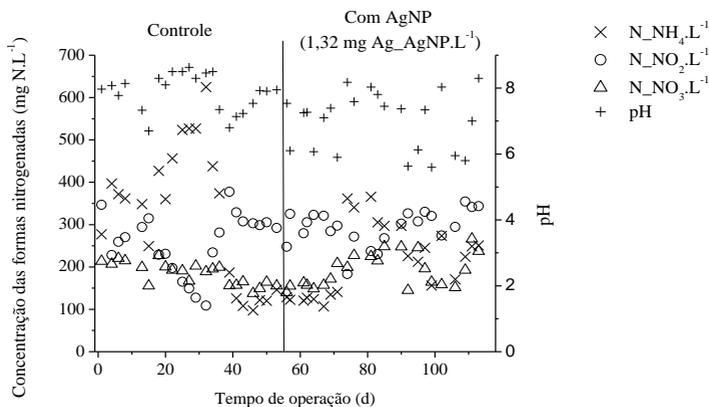
No mesmo dia em que o reator foi monitorado durante o ciclo de operação, foi coletada amostra, tanto do sobrenadante do reator, como do reator homogeneizado, coletando também a biomassa. Ambas as amostras foram analisadas (a que continha biomassa foi submetida a digestão ácida) em ICP-MS para medir a concentração de íons de prata presentes. Foi encontrado 0,2 ± 0,01 µg.L⁻¹ no sobrenadante. Na biomassa digerida em tratamento ácido foi encontrada 933,60 ± µg.L⁻¹, totalizando 0,934 mgAg⁺.L⁻¹. Nota-se que, conforme descrito na literatura (Kaegi, et al., 2011), uma parte da prata fica aderida à bactéria. Observou-se aqui a liberação de 21% de prata adicionada no reator. Esse valor é maior que aqueles encontrados durante o ensaio de inibição em batelada (Tabela 13, página 97), pois a NPAg era adicionada juntamente com a alimentação, havendo um maior tempo de exposição e, segundo Das et al. (2015), quanto maior o tempo de contato entre a bactéria e NPAg, maior a quantidade de NP aderida. Além disso, a aeração era forçada, atingindo concentrações de OD elevados o que auxilia na liberação dos íons da NP (XIU et al., 2012).

Objetivando verificar se, concentrações menores de prata poderiam exibir comportamento semelhante, ou seja, se haveria

inibição, o reator foi reinoculado e a inibição em processo contínuo de $1,32 \text{ mg Ag_NPAg.L}^{-1}$ foi verificada que corresponde a aproximadamente 10% da inibição nos testes de inibição em batelada.

Assim como no caso anterior, após a partida do reator com biomassa adaptada do reator nitrificante (reator B), aguardou-se que o mesmo atingisse a estabilidade para monitorar um ciclo e, após isso, foi adicionado NPAg juntamente na alimentação. A Figura 25 mostra o comportamento das formas nitrogenadas no efluente do reator durante os 118 dias de operação. Até o dia 55, o reator foi operado na forma “controle” sem a presença de prata. Após este dia (dia 56), até o final (dia 118), foi adicionada uma alíquota de uma solução concentrada de NPAg juntamente na alimentação, que continha em torno de $700 \text{ mg N_NH}_4^+.\text{L}^{-1}$. O pH do período controle ficou, em média $7,85$, e para fase com NP, em torno de $7,03$.

Figura 25 Monitoramento das formas nitrogenadas no efluente do reator durante o ensaio de inibição em processo contínuo controle (sem prata) e com NPAg ($1,32 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$).

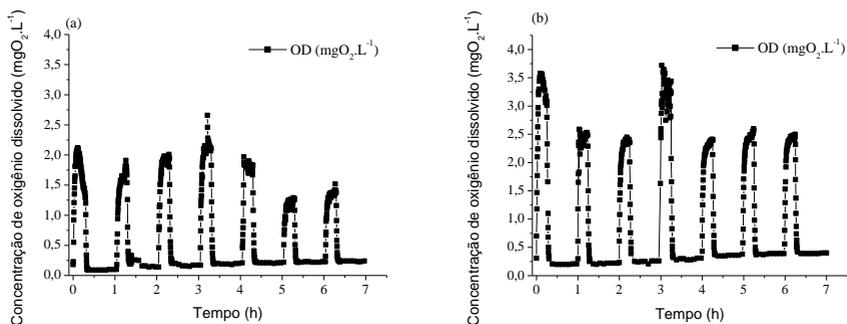


Desta vez, o reator demorou um pouco mais para atingir a estabilidade, aproximadamente 30 dias, devido a variações no pH. Após esse período, a concentração média de amônia ficou em abaixo de $200 \text{ mg N_NH}_4^+.\text{L}^{-1}$ e de nitrito subiu para em torno de $300 \text{ mg N_NO}_2^+.\text{L}^{-1}$. Após a adição de $1,32 \text{ mg Ag_NPAg.L}^{-1}$ o reator não apresentou grandes mudanças por 20 dias consecutivos (dia 76). Após esse dia o reator apresentou oscilações mais importantes, reduzindo a produção de nitrito e acumulando amônia, demonstrando sinais de inibição.

Entretanto, após aproximadamente 14 dias, o reator voltou a apresentar a atividade semelhante a inicial, mostrando uma adaptação a nova condição. Diferentemente do que aconteceu no caso testado anteriormente com uma concentração mais elevada de prata (4,53 mgAg_NPAg.L⁻¹). Neste caso, a conversão de íon amônio para nitrito, na primeira etapa de operação ficou em média em 57%, e após a adição de prata esse valor aumentou levemente para 59% (considerando sempre os períodos com maior estabilidade). Alito e Gunsch, 2013, fizeram testes com adição contínua de 2 mgNPAg.L⁻¹, durante mais de 20 dias, observaram redução da conversão de amônia nos primeiros dias de adição. Após 4 dias o reator já apresentou uma recuperação no processo de nitrificação. Os autores atribuem esse retorno a sua plena atividade a mudanças na estrutura da comunidade bacteriana nitrificante. Onde algumas espécies são mais resistentes a presença de NPAg que outras, acabam se sobrepondo às demais bactérias. Yang e colaboradores (2014) perceberam decréscimo da oxidação da amônia após 7 dias de exposição à NPAg de 35 nm, devido à redução de algumas espécies de bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas* e *Nitrosococcus*). Porém, esse trabalho não foi feito por períodos de tempo mais longos, não sendo possível verificar se haveria uma recuperação da atividade nitrificante.

Com o objetivo de verificar a influência da dosagem menor de prata sob a respiração bacteriana, foram monitorados ciclos, tanto do período sem prata como após a adição da mesma, buscando observar possíveis modificações no consumo de oxigênio pelas bactérias.

Figura 26 Variação da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do ciclo de operação, durante a etapa controle (a) e após a adição de NPAg (b) (1,32 mg Ag_NPAg.L⁻¹).



Aqui, nota-se que os dados presentes no monitoramento do ciclo sem prata (Figura 26a) os valores máximos de oxigênio dissolvido

ficaram mais baixos do que os encontrados durante o monitoramento do ciclo com NPAg (Figura 26b). A Tabela 16 indica as velocidades específicas de consumo de oxigênio para cada situação monitorada.

Tabela 16 Velocidades específicas de consumo de oxigênio antes e após a adição de NPAg (1,32 mg Ag_NPAg.L⁻¹).

Períodos aerados durante o ciclo	QO _{2c} (mgO ₂ .min ⁻¹ .gSSV ⁻¹) (controle)	QO _{2Ag25} (com 1,32 mg Ag_NPAg.L ⁻¹) (mgO ₂ .min ⁻¹ .gSSV ⁻¹)
1°	2,85	4,02
2°	2,86	3,85
3°	3,46	3,66
4°	3,68	3,74
5°	2,19	3,78
6°	2,51	3,82
7°	2,86	3,61
<i>Média</i>	<i>2,92±0,48</i>	<i>3,78±0,13</i>

Diferentemente do que aconteceu quando adicionou-se 4,53 mg Ag_NPAg.L⁻¹, a velocidade média de consumo de oxigênio ficou maior para o caso em que haviam nanopartículas presentes no meio (3,78±0,13 mgO₂.min⁻¹.gSSV⁻¹) do que no controle (2,92±0,48 mgO₂.min⁻¹.gSSV⁻¹). Tal observação concorda com a conversão média de amônia para nitrito que, também, foi superior na presença de NPAg. Esse fato pode ser atribuído a dois fatores: Primeiro, a concentração de biomassa no reator, nos dias dos ensaios estavam em 0,28 gSSV.L⁻¹ e 0,31 gSSV.L⁻¹, para o controle e com prata, respectivamente, ou seja, a biomassa cresceu embora estivesse presente no meio um composto conhecidamente tóxico. A concentração maior de biomassa, mesmo que a diferença seja pequena, acarreta maior consumo de oxigênio, contrariando o que foi mostrado na Figura 26, onde os picos mais baixos nos períodos aerados da etapa controle, indicariam uma maior atividade. Isso pode demonstrar que para esta concentração de NPAg, não é apresentado nenhum tipo de inibição, não afetando a atividade bacteriana. Em segundo lugar, pode-se supor um outro fenômeno. Muitos estudos apontam que a nanopartícula de prata, quando utilizada em concentrações muito baixas (que não causam letalidade à biomassa) na verdade estimulam o metabolismo da mesma, devido ao mecanismo de defesa do organismo, que ao detectar a presença de um composto tóxico, aumenta ainda mais sua atividade tentando produzir energia para se proteger de possíveis danos (Calabrese, 2008). Porém, esse efeito não

foi reportado para culturas mistas, apenas para culturas puras, onde a concentração subletal é muito mais baixa que a reportada aqui ($2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para *N. europaea*, Yang e colaboradores (2013a); $7,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para *E. coli*). Este efeito também é relatado quando outras bactérias do ciclo do nitrogênio foram expostas a *Quantum Dots*, onde a nitrificação, fixação e desnitrificação (todos realizados por culturas puras) foram estimuladas por baixas doses deste composto. Em geral, esse efeito é comprovado através da análise dos genes envolvidos no processo estudado. Por exemplo, no caso da oxidação da amônia, verifica-se a que o gene amônia monooxigenase está estimulado, ao invés de reprimido, como geralmente acontece na presença de compostos tóxicos.

Ao final do monitoramento do ciclo, foram coletadas amostras do sobrenadante e da biomassa para determinação da concentração de íons de prata. Foram encontrados $13,94 \pm 0,11 \mu\text{g Ag}^+\cdot\text{L}^{-1}$ e $60,60 \pm 0,60 \mu\text{g Ag}^+\cdot\text{L}^{-1}$ no sobrenadante e a amostra de biomassa digerida, respectivamente, totalizando $0,0745 \text{ mgAg}^+\cdot\text{L}^{-1}$, liberando apenas 5,64 % de prata proveniente na nanopartícula no meio. Valores menores que os encontrados aqui durante os ensaios de inibição em processo batelada para íons de prata. Portanto, não pode-se afirmar que foram os íons de causaram a inibição.

Desta forma, pode-se afirmar que os efeitos da inibição em processo contínuo da nanopartícula de prata sobre uma cultura nitrificante, é dependente da concentração existente no afluente do mesmo; podendo causar inibição quase total do sistema ou a adaptação da comunidade bacteriana ali presente, quando exposto a baixas concentrações de NPAg. Existem estudos que determinam a concentração de NPAg após a lavagens de tecidos ($1,3 \text{ mgAg}\cdot\text{L}^{-1}$) e na lixiviação por água de chuva em paredes pintadas com tintas com nanopartículas de prata ($0,145 \text{ mgAg}\cdot\text{L}^{-1}$) (BENN e WESTERHOFF, 2008; KAEGI et al., 2010). Uma vez que, esses efluentes entrem no sistema de coleta de esgotos, a sua concentração irá variar, pela própria diluição e também pela ligação da prata aos componentes deste efluente. Todavia, ainda faltam estudos que relatem a concentração real de NPAg em efluentes domésticos ou industriais, Esta é uma informação importante para avaliar, de maneira precisa, os possíveis danos dessa partícula nas plantas de tratamento de efluentes. As concentrações reportadas neste estudo, podem ocorrer em casos de derramamentos acidentais de nanopartículas de prata (durante a síntese, incorporação da NP em bens de consumo, reciclagem, etc.) podendo entrar em contato com bactérias presentes no solo, por exemplo, acarretando prejuízos a microbiota nitrificante.

5.2.5 Influência do tempo de exposição sobre comunidade nitrificante

A ação antimicrobiana da nanopartícula de prata já é amplamente conhecida. Ela pode agir por diversos mecanismos para reduzir a atividade das bactérias (produção de espécies reativas de oxigênio, aderir a membrana celular, romper a membrana, entre outros), sendo largamente utilizada para evitar a proliferação de bactérias patogênicas, na desinfecção de superfícies hospitalares, materiais utilizados no tratamento de feridas e queimaduras, etc.

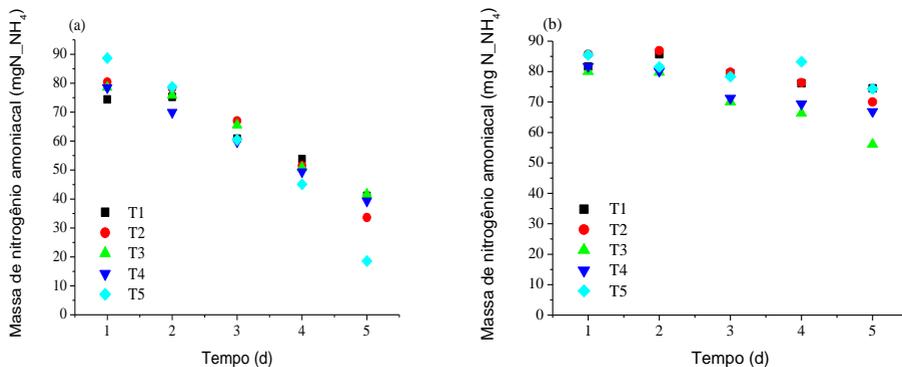
Sabe-se que, agentes desinfetantes são dependentes da dose (concentração) e do tempo de exposição (BITTON, 2005). Neste estudo, já foi verificada a influência da dose no nível de inibição das bactérias. Porém, não foi examinada a influência do tempo de exposição sobre a comunidade bacteriana estudada. Existem pesquisas que indicam que o tempo de exposição da NP_{Ag} influencia na redução da proliferação de bactérias em materiais odontológicos, sendo que resultados expressivos de desinfecção foram observados após 30 minutos de contato (PORTO, 2012). No tratamento de águas subterrâneas é possível verificar a redução em quase 100% no número de bactérias presentes na água (MACHADO, 2012). Outros estudos, comparando a ação da NP_{Ag} com demais desinfetantes comuns como o hipoclorito de sódio, verificaram que a prata, em doses muito menores é tão eficaz quanto os outros. No entanto necessita de mais tempo para atingir esta inibição. Enquanto aqueles precisaram de minutos, a nanopartícula demorou 6 horas (CHAMAKURA et al., 2011). Deste modo, tendo em mente que a NP_{Ag} pode continuar agindo sobre a bactéria após um longo período, sem haver redução de sua atividade, neste ensaio buscou-se investigar se há diferença na atividade das bactérias após diferentes tempos de exposição (5 dias).

Foram realizadas duas bateladas de ensaios em shaker orbital, onde foram testadas três diferentes concentrações de nanopartículas de prata, sempre comparando o seu resultado com um ensaio controle, sem NP_{Ag}.

Na primeira batelada, testou-se a concentração de 4,53 mg Ag_{NP}Ag.L⁻¹ (correspondente a aproximadamente 25% de inibição no teste de inibição em processo em batelada). A concentração de amônia utilizada foi de aproximadamente 400 mg N_{NH₄⁺}.L⁻¹, com volume de reação de 200 mL. A concentração de biomassa em cada frasco ficou em 0,66 mgSSV.L⁻¹. Os dados mostrados aqui em massa, devido à evaporação que ocorreu ao longo dos 10 dias de ensaio. A Figura 27 mostra o consumo de amônia no controle e nos diferentes dias de

exposição a prata, sendo que o T1 corresponde a apenas 1 dia de exposição, o T2 a dois dias e assim por diante.

Figura 27 Consumo do íon amônio durante diferentes tempos de exposição, sendo a Figura (a) o controle e (b) exposto a $4,53 \text{ mgAg_NPAg.L}^{-1}$. Onde T1 – biomassa exposta por 1 dia; T2 – por 2 dias; T3 – por 3 dias; T4 – por 4 dias e T5 – por 5 dias.



Prontamente, é possível identificar que na presença de NPAg o consumo de amônio é bem menor que no controle, devido a inibição pela nanopartícula. O pH foi controlado diariamente em torno de 7,5. No caso do controle era nítida a queda de pH devido a nitrificação, pois em todas as medições era possível detectar valores próximos a 6,0. Já os frascos com NPAg não apresentaram essa queda expressiva, sendo que o pH ficava em torno de 6,8. A Tabela 17 mostra as velocidades de consumo de íon amônio a medida que o tempo de exposição aumenta. No caso do controle, há uma maior discrepância entre os dados, após 2 e 5 dias de exposição. Entretanto essa variação não pode ser atribuída ao tempo de exposição, pois não há uma correlação entre elas. O mesmo ocorre para o caso onde há NPAg. Após 1 e 5 dias de exposição a velocidade de consumo ficou menor que as demais, porém nesses casos, o coeficiente de determinação (R^2) ficou abaixo de 0,75, indicando uma má correlação dos dados. Após 2 e 4 dias de exposição, as velocidades foram próximas, já com 3 dias foi de $6,13 \text{ mgN_NH}_4^+ \cdot \text{d}^{-1}$, superior as demais. Assim, pode-se afirmar que o tempo de exposição não apresenta uma relação clara com o nível de inibição encontrado.

Tabela 17 Velocidade de consumo de íon amônio em diferentes tempos de exposição (4,53 mgAg_NPAg.L⁻¹).

Tempo de exposição (dia)	Velocidade de consumo de íon amônio (mgN_NH ₄ ⁺ .d ⁻¹)	
	Controle	Exposto à NPAg (4,53 mgAg_NPAg.L ⁻¹)
1	10,98	2,38
2	14,95	4,19
3	11,74	6,13
4	9,88	4,57
5	14,92	2,06

A produção de nitrito ficou limitada ao controle, que atingiu aproximadamente 10 mg N_NO₂⁻. Entretanto, observou-se a produção de nitrato. Na Tabela 18 estão as velocidades de produção de nitrato nos casos aqui estudados. Nota-se que, a velocidade variou conforme o tempo de exposição, porém, de forma não linear. No caso da exposição a prata, houve produção para os três primeiros dias, contudo, muito pequena, em torno de 3 mg N_NO₃⁻. Nos demais dias não foi possível detectar produção.

Tabela 18 Velocidade de produção de nitrato em diferentes tempos de exposição (4,53 mgAg_NPAg.L⁻¹).

Tempo de exposição (dia)	Velocidade de produção de nitrato (mgN_NO ₃ ⁻ .d ⁻¹)	
	Controle	Exposto à NPAg (4,53 mgAg_NPAg.L ⁻¹)
1	8,18	0,89
2	6,46	0,064
3	8,55	0,52
4	3,59	-
5	5,77	-

A fim de verificar se, em concentrações mais baixas o mesmo comportamento seria observado, optou-se por fazer um segundo grupo de testes, com 2,56 e 1,32 mg Ag_NPAg.L⁻¹, sendo equivalentes a aproximadamente 16% e 10%, respectivamente, da inibição em processo em batelada. As condições do ensaio permaneceram as mesmas, porém, a concentração de biomassa ficou em 0,72 gSSV.L⁻¹, um pouco acima do ensaio anterior. A Figura 28 mostra os resultados do consumo de amônio nos três casos (controle (a), com 1,32 mgAg_NPAg.L⁻¹(b) e com 2,56 mgAg_NPAg.L⁻¹ (c)).

Imediatamente, nota-se a inibição no consumo de amônia, à medida que a concentração de nanopartículas de prata aumenta. Sendo

que, no caso demonstrado na Figura 28, o consumo ocorre de forma mais lenta, chegando a valores próximos a 50 mg N_NH₄⁺. O pH foi regulado diariamente para aproximadamente 7,5. Em todos os casos, havia queda do mesmo devido ao processo de nitrificação. Entretanto, não se observou diferenças nas velocidades de consumo de substrato que pudessem ser claramente relacionadas com o tempo de exposição, (Tabela 19). Apenas houve redução da velocidade com a maior concentração de NPAg.

Figura 28 Consumo do íon amônio durante diferentes tempos de exposição, sendo a Figura (a) o controle, (b) exposto a 1,32 mgAg_NPAg.L⁻¹ e (c) exposto a 2,56 mgAg_NPAg.L⁻¹ Onde T1 – biomassa exposta por 1 dia; T2 – por 2 dias; T3 – por 3 dias; T4 – por 4 dias e T5 – por 5 dias.

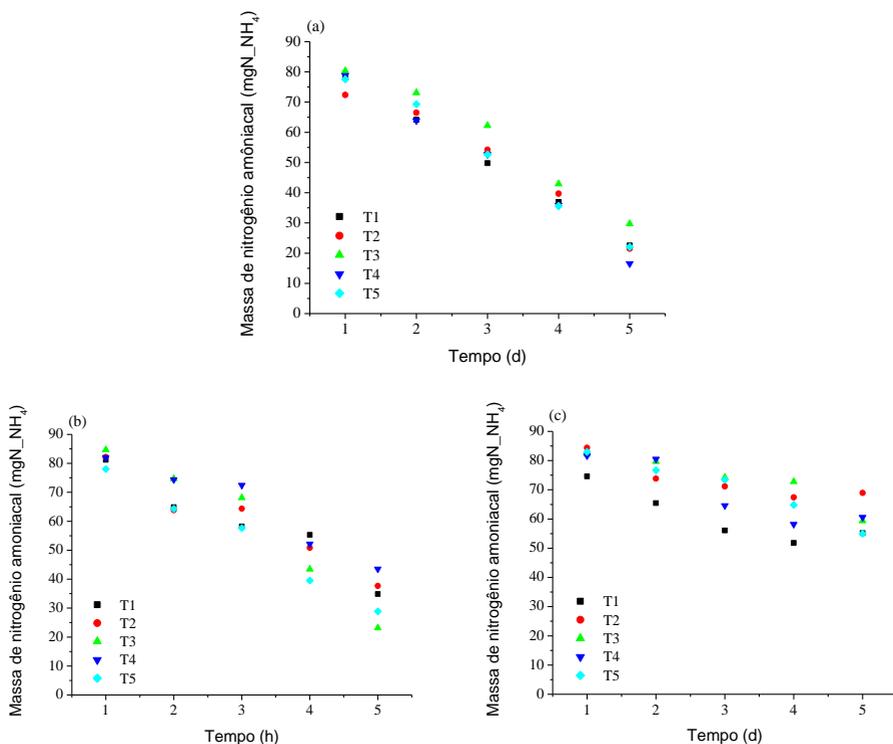


Tabela 19 Velocidade de consumo de íon amônio em diferentes tempos de exposição (1,32 mgAg_NPAg.L⁻¹ e 2,56 mgAg_NPAg.L⁻¹).

Tempo de exposição (dia)	Velocidade de consumo de íon amônio (mgN_NH ₄ ⁺ .d ⁻¹)		
	Controle	Exposto à NPAg (1,32 mgAg_NPAg.L ⁻¹)	Exposto à NPAg (2,56 mgAg_NPAg.L ⁻¹)
1	13,86	11,49	7,78
2	14,94	10,21	5,35
3	14,96	15,44	3,37
4	13,99	9,91	8,64
5	15,88	12,31	7,38

Assim como na batelada de testes anteriores (4,53 mg Ag_NPAg.L⁻¹), não há uma correlação nítida entre os tempos de exposição e as velocidades de consumo de substrato.

Não se pode notar a formação expressiva de nitrito nos casos com prata. Apenas no controle houve produção de aproximadamente 7 mgN_NO₂⁻ que foi consumida ao longo do experimento, indicando a atividade das bactérias oxidadoras de nitrito. A produção de nitrato foi mais expressiva e pode ser mensurada e utilizada para os cálculos de velocidade (na Tabela 20). A formação de nitrato nesses dois casos pode ser atribuída a forma de aeração utilizada. Como o ensaio foi realizado em shaker, não foi possível limitar a entrada de oxigênio no meio, diferentemente do que era feito no reator “B”, onde a aeração foi limitada.

Tabela 20 Velocidade de produção de nitrato em diferentes tempos de exposição (1,32 mgAg_NPAg.L⁻¹ e 2,56 mgAg_NPAg.L⁻¹)

Tempo de exposição (dia)	Velocidade de produção de nitrato (mgN_NO ₃ ⁻ .d ⁻¹)		
	Controle	Exposto à NPAg (1,32 mgAg_NPAg.L ⁻¹)	Exposto à NPAg (2,56 mgAg_NPAg.L ⁻¹)
1	11,33	5,98	-
2	10,50	4,42	-
3	10,79	6,23	-
4	11,50	4,44	-
5	9,97	5,56	-

Durante a exposição à 2,56 mgAg_NPAg.L⁻¹ não foi possível calcular a velocidade de produção de nitrato, pois ela não foi expressiva e linear.

Conforme citado anteriormente, estudos apontam que a NPAg possui maior atividade antimicrobiana após um tempo de exposição maior perante as bactérias estudadas, entretanto esses estudos fizeram comparação entre minutos e horas de exposição (CHAMAKURA et al., 2011; MACHADO, 2012; PORTO, 2012). Aqui, foi avaliada a influência entre dias de exposição sobre a comunidade bacteriana, uma vez que quando ocorre algum pulso, algum choque dessa NP em sistemas de tratamento de efluentes, ou mesmo na natureza, ela ficará presente por mais tempo que apenas algumas horas. Assim, a investigação sobre a influência do tempo sobre a cultura foi necessária para melhorar a compreensão do mecanismo de ação da NPAg. Concluiu-se que a capacidade de reduzir a atividade bacteriana está ligada apenas a concentração da nanopartícula de prata, tendo capacidade de agir assim que entra em contato com os microrganismos, ficando ativa por longos períodos.

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS OBTIDOS COM CULTURA PURA E MISTA

Neste item compara-se, brevemente, os resultados obtidos com ambas as culturas, visando relacionar os efeitos principalmente da nanopartícula de prata sobre a *Nitrosomonas europaea* e a cultura mista, enriquecida em bactérias oxidadoras de amônia, a qual a bactéria estudada pertence.

A principal diferença entre os cultivos investigados está na concentração de NPAg necessária para apresentar inibição. Para a cultura pura, a concentração máxima estudada foi de 0,75 mg Ag_NPAg.L⁻¹ e apresentou 42,64% de inibição da formação de nitrito. Já, para cultura mista, essa concentração não apresentou nenhuma inibição em ensaios preliminares. Para atingir inibição semelhante foi necessário adicionar aproximadamente 9 mg Ag_NPAg.L⁻¹ (de acordo com a equação gerada, Figura 18, página 95) e a máxima inibição foi de 90,73% (30 mg Ag_NPAg.L⁻¹). Logo, é possível afirmar que a cultura mista, ou seja, aquela que é mais próxima da realidade em estações de tratamento de efluentes é mais resistente à presença de nanopartículas de prata. Isso pode ser atribuído principalmente a complexidade da composição do meio nutritivo de culturas mistas e também a presença de outras bactérias no meio. Ou seja, a nanopartícula, juntamente com os íons liberados por ela, age sobre toda comunidade microbiana ali presente, sendo umas bactérias mais e outras menos suscetíveis a presença deste composto. Ao compararmos dados da literatura, observa-

se uma concordância para os dados obtidos aqui. Yuan e colaboradores (2013) verificaram que a atividade bacteriana de *N. europaea* foi reduzida em 50% para concentrações variando entre 0,91, 0,36 e 2,9 mg.L⁻¹, para diferentes nanopartículas de prata utilizadas por eles. Entretanto, Choi e Hu, 2008, atingiram apenas 23% de inibição com 24 mg Ag_NPAg.L⁻¹ utilizando nanopartículas com 21 nm de diâmetro sobre uma cultura enriquecida em bactérias oxidadoras de amônia. Os mesmos autores reportaram mais de 50% de inibição, com 3 mg Ag_NPAg.L⁻¹ quando a NPAg tinha um diâmetro de 9 nm, indicando forte relação entre o tamanho e a inibição. Yang e colaboradores (2014) encontraram 100% de inibição na atividade nitrificante de um lodo ativado com 40 mg Ag_NPAg.L⁻¹, após 7 dias de exposição. Nota-se, portanto, que o nível de redução da atividade de determinada cultura está relacionado com a complexidade do meio e da cultura microbiana envolvida. Wang e colaboradores (2003) estudaram a interação da prata com os constituintes da efluentes domésticos e com o lodo de sistemas de tratamento biológico. Entre outros fatores, perceberam a interação da prata com materiais orgânicos dissolvidos e com o próprio lodo, sendo que este está relacionado a pHs levemente ácidos. Materiais orgânicos estão sempre presentes em águas residuárias e a sua interação com NPAg contribui para a redução do seu potencial inibitório. Outro fator que colabora para a redução do efeito tóxico em culturas mistas são sulfetos, que se ligam facilmente com o íon de prata, reduzindo em mais de 80% a inibição gerada por NPAg (CHOI et al., 2009).

Mais um comportamento diferente entre as duas culturas utilizadas, pura e mista, está relacionado a inibição gerada por diferentes concentrações de nanopartícula ou do íon. Observando os gráficos representados em: Figura 10 (página 80), Figura 18 (página 95) e Figura 21 (página 99) observa-se que tal correlação é linear na cultura pura e segue um polinômio de segunda ordem nos casos de cultura mista. Comprovando mais uma vez que a complexidade de sistemas de nitrificantes, próximos aos reais, interfere na ação deste composto tóxico, com as inúmeras espécies presentes na biomassa apresentarem diferentes sensibilidades.

Ao analisar-se a expressão dos genes pesquisados na cultura de *Nitrosomonas europaea* com os resultados obtidos na cultura mista, pode-se principalmente relacionar o comportamento de redução da oxidação do íon amônio, pois o comportamento é análogo. A expressão do gene responsável pela formação da enzima amônia monooxigenase é reprimida na presença de NPAg e Ag⁺ nas concentrações estudadas pela cultura pura. Nos gráficos mostrados na Figura 16 (página 93) e na

Figura 19 (página 98) nota-se nitidamente a inibição da oxidação da amônia a medida que a concentração de prata aumenta, provavelmente devido a repressão desses genes. Comportamento semelhante teve o gene *hao2*, que codifica a enzima hidroxilamina oxidoredutase, responsável pela formação do nitrito após a formação da hidroxilamina, que possui maior inibição com concentrações maiores de prata. No caso da inibição em processo contínuo com $4,53 \text{ mg Ag_NPAg.L}^{-1}$ também houve inibição da oxidação da amônia. Provavelmente a amônia monooxigenase também foi reprimida neste, caso, reduzindo a velocidade de oxidação da NH_4^+ .

Deste modo, conclui-se que a pesquisa com cultura pura é um guia para compreendermos o que pode ocorrer em sistemas mais complexos, indicando comportamentos na presença de compostos tóxicos, sendo mais fáceis de compreender os resultados devido a sua simplicidade. No entanto, pesquisas em sistemas complexos como o estudado aqui refletem problemas reais que podem ocorrer de fato em instalações que visam tratar águas residuais.

A nanopartícula de prata possui muitas variações (tamanho, recobrimento, forma, etc.) que influenciam na sua capacidade antimicrobiana. O meio em que ela está inserida também gera diferentes reações toxicológicas, sendo que esse estudo indica algumas consequências que a liberação desta substância ao meio pode causar.

6 CONCLUSÕES

- A partir desse estudo pode-se concluir que a inibição gerada por nanopartículas de prata e seus respectivos íons aumenta com o aumento de sua concentração, tanto para cultura pura, quanto para a mista;

- Para a cultura pura, a formação de nitrito foi inibida completamente na presença de AgNO_3 (íons de prata). Quando o ensaio continha nanopartículas de prata, quanto maior a concentração de NPAg, menor a velocidade de formação de nitrito. Essa cultura parece se adaptar a presença de NPAg, uma vez que todos os casos produziram aproximadamente a mesma concentração de nitrito;

- A análise da expressão gênica permitiu verificar que a presença de íons e nanopartículas de prata inibem a atividade da *Nitrosomonas europaea*, através da redução da atividade enzimática da amônia monooxigenase. E está ligada a concentração de nanopartícula, em concentrações baixas não há alteração da expressão de alguns genes, sendo possível ocorrer a oxidação da amônia e a formação de nitrito. Indicaram também que existe a possibilidade de formar gases de efeito estufa, na presença desse tóxico pela oxidação da hidroxilamina para o óxido nítrico;

- A nanopartícula de prata utilizada nos ensaios de cultura mista possui as seguintes características: potencial zeta de $-26,1 \pm 0,65$ mV, diâmetro médio de 44 nm e formato, em geral, esférico;

- A inibição em processo em batelada perante a comunidade enriquecida de bactérias oxidadoras de amônia teve maior impacto pelos íons de prata, sendo que o KI50 foi de $0,357 \text{ mg AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e para as nanopartículas foi de $10,75 \text{ mg Ag_NPAg} \cdot \text{L}^{-1}$. Já na cultura pura esse valor foi $0,85 \text{ mg Ag_NPAg} \cdot \text{L}^{-1}$. Indicando que a maior complexidade do meio presente no cultivo de culturas mistas é capaz de reduzir a capacidade inibitória da NPAg;

- Durante os ensaios de inibição em processo contínuo pode-se observar que concentrações não totalmente inibitórias nos ensaios de inibição em batelada causam colapso do sistema nitritante a longo prazo, devido ao acúmulo de amônia, composto conhecidamente tóxico em concentrações elevada;

- A avaliação da influência do tempo de exposição da NPAg sobre a cultura nitritante mostrou uma independência desse fator sobre a microbiota, sendo que a inibição gerada depende exclusivamente da concentração de prata adicionada.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a influência da nanopartícula de prata sobre a expressão dos genes de uma cultura enriquecida, com bactérias nitrificantes, buscando relacionar tais resultados com dados obtidos em ensaios cinéticos;
- Verificar a inibição em processo contínuo de NPAg sobre uma cultura nitrificante, não apenas nitritante, com um meio nutritivo mais complexo, sem a remoção de sais normalmente utilizados em cultivos;
- Avaliação do pH sobre a capacidade inibitória de NPAg;
- Avaliar a influência da concentração celular nos níveis de inibição pela NPAg;
- Verificar as diferentes vias de síntese de NPAg e como elas influenciam as bactérias nitrificantes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU EL-NOUR, K. M. M.; EFTAIHA, A.; AL-WARTHAN, A.; AMMAR, R. A. A. **Synthesis and applications of silver nanoparticles**. *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 3, p. 135–140, 2010.

ALBERTS, B.; JOHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. e WALTER, P. **Manipulação de proteínas, DNA e RNA** em: *Biologia molecular da Célula*. 5ª edição, Ed. Artmed, p. 501 -578, 2010.

ALITO, C., L. e GUNSCH, C. K. **Assessing the Effects of Silver Nanoparticles on Biological Nutrient Removal in Bench-Scale Activated Sludge Sequencing Batch Reactors**. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, p. 970–976, 2013.

ALQUÉRES, S. C.; OLIVEIRA, J. H. M.; NOGUEIRA, E.M.; GUEDES, H. V.; OLIVEIRA, P. L.; CÂMARA, F.; BALDANI, J. I. e MARTINS, O. B.. **Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus***. *Arch. Microbiol.*, vol. 192, p. 835–84, 2010.

ALVAREZ-PUEBLA, R. A.; ARCEO, E.; GOULET, P. J. G.; GARRIDO, J. J. e AROCA, R. F. **Role of Nanoparticle Surface Charge in Surface-Enhanced Raman Scattering**. *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, p. 3787-3792, 2005.

AMANN, R.I.; BINDER, B.J.; OLSON, R.J.; CHISHOLM, S.W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. **Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations**. *Appl Environ. Microbiol.*, vol. 56, p. 1919–25, 1990.

APHA, AWWA, WEF, **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21ª Ed. American Public Health Association. Washington, DC, 2005.

ARNAOUT, C.L. e GUNSCH C. K. **Impacts of Silver Nanoparticle Coating on the Nitrification Potential of *Nitrosomonas europaea***. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, p. 5387–5395, 2012.

ASHKARRAN, A. A. A novel method for synthesis of colloidal silver nanoparticles by arc discharge in liquid. *Current Applied Physics*, vol. 10, p. 1442 - 1447, 2010.

ATLAS, R. M. e BARTHA, R.. **Ecologia microbiana e Microbiologia ambiental**. Madrid: Pearson Education S.A., 2002.

BALI, R.; SIEGELE, R. e HARRIS, A. T. **Biogenic Pt uptake and nanoparticle formation in *Medicago sativa* and *Brassica juncea***. *Journal Nanopart. Res.*, vol. 12, p. 3087–3095, 2010.

BEDÊ, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas** Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia. 2010.

BEER, C. FOLDBJERG, R. ; HAYASHI, Y.; SUTHERLAND, D. S. e AUTRUP, H. **Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion?** *Toxicology Letters*, vol. 208, p. 286– 292, 2012.

BENN, T. M. e WESTERHOFF,P.. **Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics**. *Environ Sci Technol.*, vol. 42(11), p .4133-4139, 2008.

BERNET, N. e SPÉRANDIO, M. **Principles of nitrifying processes**. Em: *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution: Principle and Engineering*. IWA Publishing. London, UK, 2009.

BHUSHAN, B. **Introduction to Nanotechnology**. Em *Springer Handbook of Nanotechnology*, Bhushan, B., Ed. Springer Berlin Heidelberg, p. 1-13. 2010.

BISWAS, P. E WU, C..**Nanoparticles and the Environment**. *Journal of the Air & Waste Management Association*, vol. 55(6), p. 708-746, 2005.

BITTON, G.; **Wastewater Microbiology** John Wiley & Sons, inc.

BOUGARDA, D.; BERNET, N; CHÈNEBY, D. e DELGENE, J. P. **Nitrification of a high-strength wastewater in an inverse turbulent bed reactor: Effect of temperature on nitrite accumulation** *Process Biochemistry*, vol. 41, p. 106–113, 2006.

BOUVIER, T. e del GIORGIO, P.A. **Factors influencing the detection of bacterial cells using fuorescence in situ hybridization (FISH): A**

quantitative review of published reports. FEMS Microbiology Ecology, vol. 44, p. 3-15, 2003.

BRESSAN, C.R. **Toxicidade do antibiótico sulfato de colistina empregado na suinocultura sobre processos microbiológicos relacionados ao tratamento de efluentes.** Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2012.

BUZEA, C.; BLANDINO, I.I.P. e ROBBIE K. **Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity.** Biointerphases, vol. 2 (4), p. MR17 - MR172, 2007.

CABALLERO-GUZMAN, A.; SUN, T. e NOWACK, B. **Flows of engineered nanomaterials through the recycling process in Switzerland.** Waste Management, vol. 36, p. 33–43, 2015.

CALABRESE, E.J. **Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists.** Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 27 (7), p. 1451–1474, 2008.

CAMPOS, J. L., GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. M., MÉNDEZ R. e LEMA J. M. **Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit.** Bioresource Technology, vol. 68, p. 141-148, 1999.

CANFIELD, D.E.; GLAZER, A.N. E FALKOWSKI, P.G. **The evolution and future of Earth's nitrogen cycle.** Science, vol. 330, p. 192–96, 2010.

CANZIANI, R.; EMONDI, V.; GARAVAGLIA, M.; MALPEI, F.; PASINETTI, E. e BUTTIGLIERI, G. **Effect of oxygen concentration on biological nitrification and microbial kinetics in a cross-flow membrane bioreactor (MBR) and moving-bed biofilm reactor (MBBR) treating old landfill leachate.** Journal of Membrane Science, vol. 286, p. 202–212, 2006.

CARLSON, C.; HUSSAIN, S. M.; SCHRAND, A. M.; BRAYDICH-STOLLE, L. K.; HESS, K. L.; JONES, R. L. e SCHLAGER, J. J. **Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species.** J. Phys. Chem. B, vol. 112, p. 13608–13619, 2008.

CARUCCI, A.; CAPPAL, G. e PIREDDA, M. **Biodegradability and toxicity of pharmaceuticals in biological wastewater treatment plants.**

Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, vol. 41 (9), p.1831-1842, 2006.

CASTRO-LONGORIA, E.; VILCHIS-NESTORB, A.R. e AVALOS-BORJA, M. **Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa***. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol.83 (1), p. 42–48, 2011.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E. e YOUNGS, V. L. **Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid**. *Comum Soil Sci Plant Anal.*, vol 6, p.71-80, 1975.

CHAIN, P.; LAMERDIN, J.; LARIMER, F.; REGALA, W.; LAO, V.; LAND, M.; HAUSER, L.; HOOPER, A.; KLOTZ, M.; NORTON, J. et al. **Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea***. *J. Bacteriol.*, vol. 185, p.2759–2773, 2003.

CHAIRUANGKITTI, P.; LAWANPRASERT, S.; ROYTRAKUL, S.; AUEVIRIYAVIT, S.; PHUMMIRATCH, D.; KULTHONG, K.; CHANVORACHOTE, P. e MANIRATANACHOTE, R. **Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways**. *Toxicology in Vitro*, vol. 27, 330–338, 2013.

CHAMAKURA K.; PEREZ-BALLESTERO, R.; LUO, Z.; BASHIR, S. e LIU, J. **Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 84, p. 88–96, 2011.

CHANDRAN, K.; STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. e VAN LOOSDRECHT, M. C.M. **Nitrous oxide production by lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria and implications for engineered nitrogen-removal systems**. *Biochemical Society Transactions*, vol. 39 (6), p. 1832 – 1837, 2011.

CHANG, L.; ALI, S. W.; LI-BO, G.; FANG-BO, Y.; SHUN-PENG, L. e WONG, M. H. **Biotreatment of o-nitrobenzaldehyde manufacturing wastewater and changes in activated sludge flocs in a sequencing batch reactor**. *Bioresource Technology*, vol. 104, p. 228–234, 2012.

- CHOI, O. e HU, Z. **Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria**. Environ. Sci. Technol., vol. 42, p. 4583–4588, 2008.
- CHOI, O.; CLEVINGER, T.E.; DENG, B.; SURAMPALLI, R.Y.; ROSS, JR. L. e HU, Z. **Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity**. Water Research, vol. 43, p. 1879 – 1886, 2009.
- CHOI, O.; DENG, K.K.; KIM, N.J.; ROSS JR.; L., SURAMPALLI, R.Y. e HU, Z.. **The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth**. Water Research, vol. 42, p. 3066 – 3074, 2008.
- COLMAN, B.P.; ARNAOUT, C.L.; ANCIAUX, S.; GUNSCH, C.K.; HOCELLA, M.F.; KIM, B.; LOWRY, G.V.; MCGILL, B.M.; REINSCH, B.C.; RICHARDSON, C.J.; UNRINE, J.M.; WRIGHT, J.P.; YIN L. e BERNHARDT, E.S. **Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario**. PLoS One, vol. 8(2), p. 1-10, 2013
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução 397, 2008.
- DAIMS, H.; NIELSEN, P.H.; NIELSEN, J.L.; JURETSCHKO, S. e WAGNE, M. **Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology**. Water Science and Technology, vol. 41 (4-5), p 85–90, 2000.
- DAS, P.; WILLIAMS, C.J.; FULTHORPE, R.R.; HOQUE, M.E.; METCALFE, C.D. e XENOPOULOS, M.A. **Changes in Bacterial Community Structure after Exposure to Silver Nanoparticles in Natural Waters**. Environ. Sci. Technol., vol. 46, p. 9120–9128, 2012.
- DORIGO, U.; VOLATIER, L. e HUMBERT, J.F. **Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities**. Water Research, vol. 39, p. 2207–2218, 2005.
- EL-BADAWY, A., FELDHAKKE, D. e VENKATAPATHY R.. **State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More**. EPA/600/R-10/084, 2010.

ETTWIG, K.F.; BUTLER, M.K.; LE PASLIER, D.; PELLETIER, E.; MANGENOT, S. et al. **Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria.** Nature, vol. 464, p. 543–48, 2010.

ETTWIG, K.F.; VAN ALEN, T.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K.T.; JETTEN, M.S.M E STROUS, M. **Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum.** Appl. Environ. Microbiol., vol. 75, p. 3656–62, 2009.

FABREGA, J.; LUOMA, S. N.; TYLER, C. R.; GALLOWAY, T. S. e LEAD, J.R. **Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment.** Environment International, vol. 37.P. 517–531, 2011.

FAYAZ, A, M.;BALAJI, K.; GIRILAL, M.; YADAV, R.; KALAICHELVAN, P. T. e VENKETESAN, R. **Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, vol. 6 (1), p. 103-109, 2010.

FENG, Q. L.; WU, J. ; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z. ; KIM, T. N. e KIM, J. O. **A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.** J. Biomed. Mater. Res., vol. 52(4), p. 662-668, 2000.

FERRETTI, E. C. **Remoção de Nitrogênio via Nitrito de Efluentes com Elevadas Concentrações de Nitrogênio e Baixas Relações DQO/N em Reator Operado na Forma de Bateladas Sequenciais (SBR).** . Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

GIESEKE, A; TARRE, S.; GREEN, M e BEER, D. **Nitrification in a Biofilm at Low pH Values: Role of In Situ Microenvironments and Acid Tolerance.** Applied and Environmental Microbiology, vol.72, p. 4283 -4292, 2006.

GILBRIDE, K.A.; LEE, D.Y. E BEAUDETTE, L.A. **Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control.** Journal of Microbiological Methods, vol. 66, p. 1–20, 2006.

- GRUNDITZ, C. e DALHAMMAR, G. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. **Water Research**, vol. 35 (2), p. 433-440, 2001.
- GU, L.; LI, Q.; QUAN, X.; CEN, Y. e JIANG, X. **Comparison of nanosilver removal by flocculent and granular sludge and short- and long-term inhibition impacts**. *Water Research*, vol, 58, p. 62 -70, 2014.
- GUINGAB, J. D.; LAULY, B.; SMITH, B. W.; OMENETTO, N. e WINEFORDNER, J. D. **Stability of silver colloids as substrate for surface enhanced Raman spectroscopy detection of dipicolinic acid** *Talanta*, vol. 74, p. 271-274, 2007.
- GUPTA, A. e SILVER, S.. Molecular Genetics: **Silver as a biocide: Will resistance become a problem?** *Nature Biotechnology*, vol. 16 (10), 1998.
- GURUNATHAN, S.; KALISHWARALAL, K.; VAIDYANATHAN, R.; DEEPAK, V.; PANDIAN, S. R. K.. MUNIYANDI, J.; HARIHARAN, N. e EOM, S.H.. **Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli***. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 74 (1), p. 328–335, 2009.
- GUZMÁN, M. G.; DILLE, J. e GODET, S. **Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity**. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, vol. 2, p.7-27, 2008.
- HAJIPOUR, M.J.; FROMM, K.M.; ASHJARRAN, A.A.; ABERASTUR, D. J.; Larramend, I.R.; ROJO, T.; SERPOOSHAN, V.; PARAK, W.J. e MAHMOUDI, M. **Antibacterial properties of nanoparticles**. *Trends in Biotechnology*, vol. 30 (10), p. 499-511, 2012.
- HELLINGA, C.; SCHELLEN, A. A. J. C. e MULDER, J. W. **The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonim-rich wastewater**. *Water Science and Technology*, vol. 37(9), p. 135, 1998.
- HENGLEIN, A. e GIERSIG. M. **Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate**. *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, p. 9533-9539, 1999.

HENZE, M.; HARREMOES, P.; JANSEN, J.C.E e ARVIN, E. **Wastewater treatment – Biological and chemical process**. Springer Verlag, 2a Ed., 1997.

HOLT, K. B. e BARD, A. J. **Interaction of Silver(I) Ions with the Respiratory Chain of *Escherichia coli*: An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of the Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag⁺**. *Biochemistry*, vol. 44, p. 13214-13223, 2005.

HOOPER, A.B. e TERRY K.R. **Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas* production of nitric-oxide from hydroxylamine**. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 571, p. 12–20, 1979.

HUANG, Z.; GEDALANGA, P.B.; ASVAPATHANAGUL, P. E OLSON, B.H. **Influence of physicochemical and operational parameters on *Nitrobacter* and *Nitrospira* communities in an aerobic activated sludge bioreactor**. *Water Research*, vol. 44, p. 4351 – 4358, 2010.

HUNT M. Real time PCR tutorial, 2010 [acessado em 27 mai. 2014]. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>.

ISLAS-LIMA, S.; THALASSO, F. E GOMEZ-HERNANDEZ, J. **Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification**. *Water Res.*, vol. 38, p. 13–16, 2004.

JASON, L.; CANTERA, L. e STAIN, Y. **Molecular diversity of nitrite reductase genes (*nirK*) in nitrifying bacteria**. *Environmental Microbiology*, vol. 9(3), 765-776, 2007.

JIN, X.; LI, M.; WANG, J.; MARAMBIO-JONES, C.; PENG, F.; HUANG, X.; DAMOISEAUX, R. e HOEK, E.M V. **High-Throughput Screening of Silver Nanoparticle Stability and Bacterial Inactivation in Aquatic Media: Influence of Specific Ions**. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, p. 7321–7328, 2010.

KAEGI, R.; SINNET, B.; ZULEEG, S.; HAGENDORFER, H.; MUELLER, E.; VONBANK, R.; BOLLER, M. e BURKHARDT, M. **Release of silver nanoparticles from outdoor facades**. *Environmental Pollution*, vol. 158, p. 2900-2905, 2010.

KAEGI, R.; VOEGELIN, A. SINNET, B.; ZULEEG, S.; HAGENDORFER, H.; BURKHARDT, M. e SIEGRIST, H. **Behavior**

of Metallic Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant. Environ. Sci. Technol., vol 45, p. 3902–3908, 2011.

KAMPSCHREUR, M. J.; TEMMINK, H.; KLEEREBEZEM, R.; JETTEN, M.S.M. e VAN LOOSDRECH, M.C.M. **Nitrous oxide emission during wastewater treatment.** Water Research, vol. 43, p. 4093–4103, 2009.

KAMPSCHREUR, M. J; VAN DER STAR, W.R.L.; WIELDERS, H. A.; MULDER, J.W.; JETTEN, M.S.M. e VAN LOOSDRECH, M.C.M. **Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during full-scale reject water treatment.** Water Research, vol.42, p. 812 – 826, 2008.

KHALIL, M. M.H.; ISMAIL, E. H.; EL-BAGHDADY, K.Z. e MOHAMED, D. **Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity.** Arabian Journal of Chemistry, vol. 7(6), p. 1131-1139, 2013.

KHAN, S. S.; SRIVATSAN, P.; VAISHNAVI, N.; MUKHERJEE, A. e CHANDRASEKARAN, N. **Interaction of silver nanoparticles (SNPS) with bacterial extracellular proteins (ECPS) and its adsorption isotherms and kinetics.** Journal of Hazardous Materials, vol. 192 (1), p. 299–306, 2011.

KHOLOUD M.M.; EL-NOUR A.; EFTAIHA, A.; AL-WARTHAN, A. E AMMAR, R.A.A. **Synthesis and applications of silver nanoparticles.** Arabian Journal of Chemistry, vol. 3, p.135–140, 2010.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.; PARK, S.J.; LEE, H.J.; KIM, S.H.; PARK, Y.K. et al. **Antimicrobial effects of silver nanoparticles.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, vol. 3, p. 95 – 101, 2007.

KIM, J.; LIM, J. e LEE, C.. **Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations.** Biotechnology Advances, vol. 31, p. 1358 – 1373, 2013.

KIM, J.; PITTS, B.; STEWART, P.S.; CAMPER, A. e YOON, J.. **Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm.** Antimicrobial Agents Chemother, vol. 52(4), p. 1446–1453, 2008.

KLAUS, T.; JOERGER, R., OLSSON, E. e GRANQVIST, C. **Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated..** PNAS, vol 96 (24), p. 13611-13614, 1999.

KOOL, D.M.; DOLFNG, J.; WRAGE, N. e VAN GROENIGEN, J.W. **Nitrifier denitrification as a distinct and significant source of nitrous oxide from soil.** Soil Biol. Biochem., vol. 43, p. 174–178, 2011.

LADEIRA, P.R.S.; ISAAC, C. E FERREIRA, M.C. **Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real/ Real-time reverse transcription polymerase chain reaction.** Rev. Med., vol. 90(1), p.47-51, 2011.

LEM, K.W.; CHOUDHURY, A.; LAKHANI, A.A.; KUYATE, P.; HAW, J.R.; LEE, D.S.; IQBAL, Z. e BRUMLIK, C.J. **Use of Nanosilver in Consumer Products.** Recent Patents on Nanotechnology, vol. 6, p. 60-72, 2006.

LIANG, Z.; DAS, A. e HU, Z.. **Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system.** Water Research, v.. 44, p. 5432 - 5438, 2010.

LIU, J. e HURT, R. H.. **Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids.** Environ. Sci. Technol., vol. 44, p. 2169–2175, 2010.

LIVAK, K. J. e SCHMITTEN, T. D.. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT}.** Method Methods., vol. 25 (4), P. 402–408, 2001.

LOGEMANN, S.; SCHANTL, J.; BIJVANK, S.; VAN LOOSDRECHT, M.; KUENEN, J. G.e JETTEN, M. **Molecular microbial diversity in a nitrifying reactor system without sludge retention.** FEMS Microbiology Ecology, vol. 27, p.239-249, 1998.

LOWRY, G.V., ESPINASSE, B.P., BADIREDDY, A.R.; RICHARDSON, C.J.; REINSCH, B.C.; BRYANT, L.D.; et al. **Long-Term Transformation and Fate of Manufactured Ag Nanoparticles in a Simulated Large Scale Freshwater Emergent Wetland.** Environ. Sci. Technol., vol. 46, p. 7027–7036, 2012.

LU, W.; SENAPATI, D.; WANG, S.; TOVMACHENKO, O.; SINGH, A. K.; YU, H. e RAY, P. C. **Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes.** Chemical Physics Letters, vol. 487, p. 92–96, 2010.

MA, Y.; METCH, J.W.; VEJERANO, E.P.; MILLER, I.J.; LEON, E.C.; MARR, L.C.; VIKESLAND, P. J. e PRUDEN, A. **Microbial community response of nitrifying sequencing batch reactors to silver, zero-valent iron, titanium dioxide and cerium dioxide nanomaterials.** Water Research, vol. 68, p. 87-97, 2015.

MACHADO, F. M. **Avaliação do uso de nanopartículas de prata e atividade antimicrobiana para tratamento de águas.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

MADIGAN, T.M.; MARTINKO, J.M. e PARKER, J. **Brock biology of microorganism.** Prentice Hall, Inc. 8ªEd., N.Y, 1997.

MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S. e TSUCHIDO, T. **Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate.** Appl. Environ. Microbiol., vol. 69, p. 4278–4281, 2003.

MCSHAN, D.; RAY, P.C. e YU, H. **Molecular toxicity mechanism of nanosilver.** Journal of food and drug analysis, vol. 22, p. 116 e 127, 2014.

MENON, A. K.; GUPTA, B. K. **Nanotechnology: a data storage perspective.** Nanostructured Materials. vol. 12, p. 1117 – 1125, 1999.

METZ, S.; BEISKER, W. HARTMANN, A. E SCHLOTTER, M. **Detection methods for the expression of the dissimilatory copper-containing nitrite reductase gene (*DnirK*) in environmental samples.** Journal of Microbiological Methods. vol. 55, p.41 – 50, 2003.

MEYER, J. N.; LORD, C. A.; YANG, X.Y.; TURNER, E. A.; BADIREDDY, A. R.; MARINAKOS, S. M.; CHILKOTI, A.; WIESNER, M. R. e AUFFAN, M. **Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*.** Aquatic Toxicology, vol. 100, p. 140–150, 2010.

MICHELS, C. **Utilização de tiosulfato como doador de elétrons para remoção de nitrogênio via Nitrificação e desnitrificação autotrófica em Reator SBR.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

MITRANO, D. M.; MOTELLIER, S.; CLAVAGUERA, S. e NOWACK, B. **Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products.** Environment International, vol. 77, p.132–147, 2015.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A. e TRAN, C.L. **Nanotoxicology: Characterization, dosing and health effects.** Informa Healthcare, New York, 2007.

MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J.L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.B.; RAMIREZ E J.T. e YACAMAN, M.J.. **The bactericidal effect of silver nanoparticles.** Nanotechnology. vol. 16. p. 2346 - 2353, 2005.

MUELLER, N.C. e NOWACK, B. **Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment.** Environ Sci Technol., vol. 42, p.4447–53, 2008.

MULDER, A.; VAN DE GRAAF A.A.; ROBERTSON, L.A. e JUENEN, J.G. **Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor.** FEMS Microbiol. Ecol., vol.16, p. 177-184, 1995.

MUTH-KOHNE, E.; SONNACK, L.; SCHLICH, K.; HISCHEN, F.; BAUMGARTNER, W.; HUND-RINKE, K.; SCHAFERS, C. e FENSKE, M. **The toxicity of silver nanoparticles to zebrafish embryos increases through sewage treatment processes.** Ecotoxicology, vol. 22, p.1264–1277, 2013.

Nanotech-enabled Consumer Products Continue to Rise. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/news/archive/9231/>>. Acesso em: 02/06/2013

NATION, J. L. **A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy.** Stain Technology., vol. 58, p. 347-351, 1983.

NAZERUDDIN, G.M.; PRASAD, N.R.; WAGHMARE, S.R.; GARADKAR, K.M. e MULLA, I.S. **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Azadirachta indica* leaf extract and its anti-microbial activity.** Journal of Alloys and Compounds, vol. 538, p. 272-277, 2014.

OCHOA-HERRERA, V.; BANIHANI, Q.; LEÓN, G.; KHATRI, C.; FIELD, J. A. e SIERRA-ALVAREZ, R. **Toxicity of fluoride to**

microorganisms in biological wastewater treatment systems. Water Research, vol. 43, p. 3177–3186, 2009.

OCHOA-HERRERA, V.; Q.; LEÓN; BANIHANI, , FIELD, J. A. e SIERRA-ALVAREZ, R. **Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems.** Science of the Total Environment, vol. 412-413, p. 380–385, 2011.

OTT, R.D; BLUE, C.A.; DUDNEY, N.J. e HARPER, D.C. **Pulse thermal processing of functional materials using direct plasma arc.** Patente número: US 7,220,936 B2. 2007.

PAL, S.; TAK, Y.K. e SONG, J.M. **Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*.** Applied and Environmental Microbiology, p. 1712–1720, 2007.

PANYALA, N. R., PEÑA-MÉNDEZ, E. M. e HAVEL, J. **Silver or Silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?** Journal of Applied Biomedicine, vol. 6, p. 117-129, 2008.

PERAZZOLI, S. **Avaliação do efeito das nanopartículas de óxido de ferro sobre uma comunidade de bactérias oxidadoras de amônia (BOAs).** Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2015.

PORTO, K.B. **Ação antimicrobiana da nanopartícula de prata sobre patógenos.** Monografia apresentada ao Curso de Odontologia da Universidade São Francisco, 2012.

QUADROS, M. E. e MARR, L.C. **Environmental and Human Health Risks of Aerosolized Silver Nanoparticles** Journal of the Air & Waste Management Association. vol. 60 (7). P.770 – 781, 2010.

QUADROS, M.E.; PIERSON, R.; TULVE, N.S; WILLIS, R.; ROGERS, K.; THOMAS, T.A. e MARR, L.C **Release of Silver from Nanotechnology-Based Consumer Products for Children..** Environ. Sci. Technol., vol 47, p. 8894–8901, 2013.

QUAN, X.; CEN, Y.; LU, F.; GU, L. e MA, J. **Response of aerobic granular sludge to the long-term presence to nanosilver in sequencing batch reactors: Reactor performance, sludge property,**

microbial activity and community. Science of The Total Environment, vol. 506–507, p. 226–233, 2015.

RADNIECKI, T. S.; STANKUS, D. P.; NEIGH, A.; NASON, J. A. E SEMPRINI, L.. **Influence of liberated silver from silver nanoparticles on nitrification inhibition of *Nitrosomonas europaea*.** Chemosphere, vol. 85, p. 43–49, 2011.

REIDY, B.; HAASE, A.; LUCH, A.; DAWSON, K.A. e LYNCH, I. **Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications.** Materials, vol. 6, p. 2295-2350; 2013.

RIBEIRO, F.; GALLEGU-URREA, J.A.; JURKSCHAT, K.; CROSSLEY, A.; HASSELLÖV, M.; TAYLOR, C.; SOARES, A.M.V.M. E LOUREIRO, S. **Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*.** Science of the Total Environment, vol., 466–467, p. 232–241, 2014.

RITTMAN. B. E. e MCCARTY, P.L.. **Environmental Biotechnology: Principles and Applications.** Editora McGraw-Hill, 2001.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, L.; BLANCO, M. C. E LÓPEZ-QUINTELA, M. A. J. **Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles.** Phys. Chem. B, vol. 104, p. 9683-9688, 2000.

ROLFE, M.D.; RICE, C.J.; LUCCHINI, S.; PIN C.; THOMPSON A.; CAMERON, A.D.S.; ALSTON, M.; STRINGER M.F.; BETTS, R.P.; BARANYI, J.; PECK, M.W. e HINTON, J.C. **Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation.** J. Bacteriol., vol. 194, p. 686–701, 2012.

RONGSAYAMANONT, C.; LIMPIYAKORN, T. e KHAN, E. **Effects of inoculum type and bulk dissolved oxygen concentration on achieving partial nitrification by entrapped-cell-based reactors.** Bioresource Technology, vol. 164, p. 254 – 263, 2014.

SALATA, O. **Applications of nanoparticles in biology and medicine.** Journal of Nanobiotechnology, vol. 2, p.1-6, 2004.

SALEH-LAKHA, S.; MILLER, M.; CAMPBELL, R.G.; SCHNEIDER, K.; ELAHIMANESH, P.; HART, M.M. E TREVORS, J.T. **Microbial**

- gene expression in soil: methods, applications and challenges.** Journal of Microbiological Method, vol. 63, p. 1 – 19, 2005.
- SANZ, J.L. E KOCHLING, T. **Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview.** Process Biochemistry, vol. 42,p.119–133, 2007.
- SCHAERER, M.A. **Physiological Response of *Nitrosomonas europaea* to Oxytetracycline, Chromium, and Silver.** Dissertação de Mestrado, Oregon State University, 2009.
- SCHMIDELL, W. e REGINATTO,V.S. **Remoção de nitrogênio.** Em:Tratamento biológico de águas residuárias. 1ªEdição. Florianópolis, 2007.
- SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; BOCK, E.; FUERST, J.; KUENEN, J. G.; JETTEN, M. S. M. e STROUS M.. **New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater.** FEMS Microbiology Reviews, vol. 27, p. 481-492, 2003.
- SOM, C.; WICK, P.; KRUG, P. e NOWACK, B.. **Environmental and health effects of nanomaterials in nanotextiles and façade coatings.** Environment International, vol. 37. P. 1131–1142, 2011.
- SONG, K.; SUENAGA, T.; HAMAMOTO, A.; SATOU, K.; RIYA, S.; HOSOMI, M. E TERADA, A. **Abundance, transcription levels and phylogeny of bacteria capable of nitrous oxide reduction in a municipal wastewater treatment plant.** Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 118, p. 289-297, 2014.
- SONG, K.C.; LEE, S.M.; PARK, T.S. e LEE, B.S. **Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method.** Korean J. Chem. Eng., vol. 26(1), p. 153-155, 2009.
- STAMPOLIS, D.; SINHA, S.K. e WHITE, J.C. **Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants.** Environ. Sci. Technol., vol 43, p. 9473-9479, 2009.
- STEIN, L. Y. e ARP, D. J. **Loss of Ammonia Monooxygenase Activity in *Nitrosomonas europaea* upon Exposure to Nitrite.** Applied and Environmental Microbiology, vol. 64 (10), p. 4098–4102, 1998.
- STENSBERG, M.C.; WEI, Q.; MCLAMORE, E.S.; PORTERFIELD, D.M.; WEI, A. e SEPÚLVEDA, M.S. **Toxicological studies on silver**

nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine*, vol. 6(5),p. 879–898, 2011.

TAKENAKA, S.; KARG, E.; ROTH, C.; SCHULZ, H.; ZIESENIS, A.; HEINZMANN, U.; SCHRAME, P. e HEYDER, J. 2001. **Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats.** *Environ. Health Perspect*, vol. 109(4), p. 547-551, 2001.

THAMDRUP. B. **New Pathways and Processes in the Global Nitrogen Cycle.** *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, vol. 43, p. 407–28, 2012.

TROP, M.; NOVAK, M.; RODL, S.; HELLBOM, B.; KROELL, W. e GOESSLER W. **Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient.** *J. Trauma.*, vol. 60(3), p. 648-52, 2006.

TSUNEDA, S.; NAGANO, T.; HOSHINO, T.; EJIRI, Y.; NODA, N. e HIRATA, A. **Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor.** *Water Research*, vol. 37,p. 4965–4973, 2003.

TUTTLE, G.R. **Size and Surface Area Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos (*Danio rerio*).** *Dissertação de Mestrado.* Oregon State University. 2012.

VAN HULLE, S. W.H.; VANDEWEYERB, H. J.P.; MEESSCHAERTC, B. D.; VANROLLEGHEMA, P. A.; DEJANSB, P. e DUMOULINB, A.. **Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams.** *Chemical Engineering Journal*, vol. 162, p. 1–20, 2010.

VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L. G. T.; VAZOLLER, R. F. e FORESTI, E. **Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal-flow anaerobic immobilized-sludge reactor.** *Appl. Microbiology Biotechnology*, vol. 48, p. 534-538, 1997.

VOGEL, A. I. **Análise Inorgânica Quantitativa.** Quarta edição. Rio de Janeiro.Guanabara, 1981.

WAGNER, M.; HORN, M. E DAIMS, H. **Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes.** *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, p.302–309, 2003.

WAGNER, M.; NIELSEN, P.H.; LOY, A.; NIELSEN, J.L. e DAIMS, H. **Linking microbial community structure with function:**

fluorescence in situ hybridization-microautoradiography and isotope arrays. *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 17 (1), p. 83-91, 2006.

WANG, J.; HUANG, C.P. e PIRESTANI, D. **Interactions of silver with wastewater constituents.** *Water Research*, vol. 37, p. 4444-4452, 2003.

WANG, J.; KOO, Y.; ALEXANDER, A.; YANG, Y.; WESTERHOF, S.; ZHANG, Q.; SCHNOOR, J.L.; COLVIN, V.L.; BRAAM, J. e ALVAREZ, P.J.J. **Phyostimulation of Poplars and Arabidopsis Exposed to Silver Nanoparticles and Ag⁺ at Sublethal Concentrations.** *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, p. 5442-5449, 2013.

WANG, S. e GUNSCH, C.K. **Effects of selected pharmaceutically active compounds on the ammonia oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*.** *Chemosphere*. vol. 82 (4), p. 565-572, 2011.

WIGGINTON, N.S; TITTA, A; PICCAPIETRA, F.; DOBIAS, J. ; NESATYY, V.J.; SUTER, M. J. F. e LATMANI, B. **Binding of Silver Nanoparticles to Bacterial Proteins Depends on Surface Modifications and Inhibits Enzymatic Activity.** *Environ. Sci. Technol.*, vol 44, p. 2163-2168, 2010.

WIJNHOFEN, S.; PEIJNENBURG, W.; HERBERTS, C.; HAGENS, W.; WERNER, I.; OOMEN, A.; HEUGENS, E.; ROSZEK, B.; BISSCHOPS, J.; GOSENS, I.; VAN DE MEENT, D.; KEKKERS, S.; DE JONG, W.; VAN ZIJVERDEN, M.; SIPS e GEERTSMA, A. R.. **Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment.** *Nanotoxicology*, vol. 1, p. 1-30, 2009.

WOOD, L.B.; HURLEY, B.J.E. E MATTHEWS, P.J. **Some observations on the biochemistry and inhibition of nitrification.** vol.15 (5), p. 543-551, 1981.

WU, Y.; ZHOU, Q.; LI, H.; LIU, W.; WANG, T. e JIANG, G. **Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test.** *Aquat. Toxicol.*, vol. 100 (2), p. 160-167, 2010.

XIU, Z., MA, J. e ALVAREZ, P. J. J. **Differential Effect of Common Ligands and Molecular Oxygen on Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles versus Silver Ions.** *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, p. 9003-9008, 2011.

XIU, Z.; ZHANG, Q.; PUPPALA, H.L.; COLVIN, V.L. e ALVAREZ, P.J.J. **Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles**. *Nanoletters*, vol.12, p. 4271–4275, 2012.

YANG, Y., WANG, J., XIU, Z. e ALVAREZ, P. J. J.. **Impacts Of Silver Nanoparticles On Cellular And Transcriptional Activity Of Nitrogen-Cycling Bacteria Environmental. Toxicology And Chemistry**, vol. 32(7), p. 1488–1494, 2013a.

YANG, Y.; CHEN, Q.; WALL, J. D. e HUA, Z.. **Potential nanosilver impact on anaerobic digestion at moderate silver concentrations**. *Water Research*, vol. 46, p. 1176 – 1184, 2012a.

YANG, Y.; LY, M.; MICHELS, C.; SOARES, H. M. e ALVAREZ, P.J.J. **Differential sensitivity of nitrifying bacteria to silver nanoparticles in activated sludge**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 33 (10), p. 2234–2239, 2014.

YANG, Y.; QUENSEN, J.; MATHIEU, J.; WANG, Q.; WANG, J.; LI, M.; TIEDJE, J.M. e ALVAREZ, P.J.J., **Pyrosequencing Reveals Higher Impact of Silver Nanoparticles than Ag⁺ on the Microbial Community Structure of Activated Sludge**, *Water Research*, p.317 - 325, 2014.

YANG, Y.; WANG, J.; ZHU, H.; COLVIN, V. L. e ALVAREZ, P. J.. **Relative Susceptibility and Transcriptional Response of Nitrogen Cycling Bacteria to Quantum Dots**. *Environmental Science & Technology*, vol. 46, p. 3433–3441, 2012b.

YANG, Y.; ZHANG, C. e HU, Z.. **Impact of metallic and metal oxide nanoparticles on wastewater treatment and anaerobic digestion**. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, vol. 15, p. 39-48, 2013b.

YEUNG, C.H.; FRANCIS, C.A. e CRIDDLE, C.S. **Adaptation of nitrifying microbial biomass to nickel in batch incubations**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, p. 847–857, 2013.

YUAN, Z.; LI, J.; CUI, L.; XU, B.; ZHANG, H. e YU, C. **Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria**. *Chemosphere*, vol. 90, p. 1404–1411, 2013.

YUAN, Z.; YANG, X.; HU A. e YU, C. **Long-term impacts of silver nanoparticles in an anaerobic–anoxic–oxic membrane bioreactor system**. *Chemical Engineering Journal*, vol. 276, p. 83–90, 2015.

ZDRADEK, C. P. **Seleção de linhagens oxidadoras de amônio e remoção de nitrogênio via nitrito em reator descontínuo alimentado (SBR), sob condições de limitação de oxigênio** Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina 2005.

ZDRADEK, C.P.; SCHMIDELL, W. e SOARES, H.M. **Determinação da concentração de sólidos totais: comparação entre os resultados obtidos em estufa convencional e em forno microondas.** XI MET - Encontro Nacional de Metodologias de Laboratório, SCBrasil. Anais p. 36, 2006.

ZHANG, C.; LIANG, Z. E HU, Z. **Bacterial response to a continuous long-term exposure of silver nanoparticles at sub-ppm silver concentrations in a membrane bioreactor activated sludge system.** Water Research, vol. 50, p. 350 – 358, 2014.

ZHANG, Y. ; YANG, M.; PORTNEY, N.G.; CUI, D.; BUDAK, G. OZBAY, E. et al. **Zeta potential: A surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells** Biomedical Microdevices, vol. 10(2), p. 321–328, 2008.

ZHAO, W. ; WANG, Y. ; LIN, X.; ZHOU, D.; PAN, M. E YANG, J. **Identification of the salinity-effect on N₂O production pathway during nitrification: using stepwise inhibition and ¹⁵N isotope labeling methods.** Chemical Engineering, vol. 253, p. 418-426, 2014.

ZWIRGLMAIER, K. **Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – the next generation.** FEMS Microbiology Letters, vol 246, p. 151-158, 2005.

9 ANEXO

9.1 ANEXO 1- ENSAIO ABIÓTICO

9.1.1 Teste abiótico com nanopartículas de prata

Tabela 21 Variação da concentração de nitrogênio amoniacal em ensaio abiótico com NPAg.

Tempo (h)	Concentração de nanopartícula de prata (mg Ag_NPAg.L ⁻¹)						
	0	5	10	15	20	25	30
	Concentração de nitrogênio amoniacal (mg N_NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)						
0	172,60	171,21	175,14	170,06	172,60	174,68	176,75
2	166,83	163,14	164,06	155,76	166,83	164,99	176,06
4	166,37	168,91	166,83	169,14	166,37	167,99	177,44
6	159,68	151,38	152,99	150,68	159,68	156,22	159,68
8	158,76	163,83	162,22	161,76	158,76	169,60	156,45
10	158,76	158,99	155,07	159,91	158,76	155,07	164,06
12	162,45	167,99	158,99	171,91	162,45	169,37	168,91
Média	163,63	163,63	162,18	162,75	163,63	165,41	168,48
Desvio padrão	5,21	6,79	7,51	7,98	5,21	7,27	8,64

Tabela 22 Variação do pH em ensaio abiótico com NPAg.

Tempo (h)	Concentração de nanopartícula de prata (mg Ag_NPAg.L ⁻¹)						
	0	5	10	15	20	25	30
	pH						
0	8,41	8,25	8,31	8,2	8,41	8,18	8,22
2	8,94	8,9	9,02	8,9	8,94	8,92	8,92
4	9,03	9,01	9,02	8,89	9,03	8,97	9,02
6	8,79	8,7	8,8	8,71	8,79	8,71	8,64
8	8,77	8,85	8,9	8,7	8,77	8,79	8,78
10	8,79	8,68	8,67	8,55	8,79	8,63	8,59
12	8,52	8,51	8,53	8,4	8,52	8,45	8,27

Tabela 23 Variação do OD em ensaio abiótico com NPAg.

Tempo (h)	Concentração de nanopartícula de prata (mg Ag_NPAg.L ⁻¹)						
	0	5	10	15	20	25	30
	OD (mgO ₂ .L ⁻¹)						

0	10,33	9,65	9,72	9,55	10,33	9,85	9,83
2	7,81	7,6	7,63	7,1	7,81	7,71	7,6
4	7,99	7,21	7,43	7,73	7,99	8,56	8,46
6	10,15	8,98	8,7	8,56	10,15	8,5	8,67
8	9,09	8,49	8,7	8,45	9,09	9,08	9,24
10	8,32	8,35	7,93	7,95	8,32	8,69	8,5
12	9,83	9,11	9,3	9,15	9,83	8,75	8,7

9.1.2 Teste abiótico com íons de prata

Tabela 24 Variação da concentração de nitrogênio amoniacal em ensaio abiótico com Ag^+ .

Tempo (h)	Concentração de nanopartícula de prata ($\text{mg Ag}^+ \text{-AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)					
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
	Concentração de nitrogênio amoniacal ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$)					
0	172,60	174,68	176,75	167,52	181,13	178,83
2	166,83	164,99	176,06	170,98	170,06	162,68
4	166,37	177,44	163,60	174,91	173,98	178,83
6	159,68	156,22	159,68	160,14	163,14	163,14
8	158,76	169,60	156,45	170,06	164,29	173,52
10	158,76	155,07	164,06	161,53	166,37	175,14
12	162,45	169,37	168,91	171,68	181,37	172,14
Média	163,63	166,77	166,50	168,12	171,48	172,04
Desvio padrão	5,21	8,59	7,79	5,45	7,60	6,72

Tabela 25 Variação do pH em ensaio abiótico com NP_{Ag}.

Tempo (h)	Concentração de nanopartícula de prata ($\text{mg Ag}^+ \text{-AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)					
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
	pH					
0	8,41	8,18	8,22	8,24	8,2	8,4
2	8,94	8,92	8,92	9,02	8,91	8,92
4	9,03	8,97	9,02	9,06	8,92	8,86
6	8,79	8,71	8,64	8,69	8,64	8,59
8	8,77	8,79	8,78	8,77	8,74	8,67
10	8,79	8,63	8,59	8,6	8,53	8,48
12	8,52	8,45	8,27	8,35	8,39	8,31

Tabela 26 Variação do OD em ensaio abiótico com NPAg.

Tempo (h)	Concentração de nanopartícula de prata ($\text{mg Ag}^+ \text{AgNO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)					
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
	OD ($\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$)					
0	10,33	9,85	9,83	9,77	9,78	9,7
2	7,81	7,71	7,6	7,62	7,69	7,3
4	7,99	8,56	8,46	8,34	8,2	8,33
6	10,15	8,5	8,27	8,67	8,23	8
8	9,09	9,08	8,87	9,24	9,23	8,26
10	8,32	8,69	8,61	8,5	8,44	8,25
12	9,83	8,75	8,7	8,95	8,75	8,22

9.2 ANEXO 2- LAUDO DE CONTROLE DE QUALIDADE DA NANOPARTÍCULA DE PRATA



Quality Control Summary Page

Material	Silver
Nominal Diameter (nm)	25
Product Part Number	Ag-25-ST2
Production Code	M4147
Production Date	March, 2013
Material Purity Metals Basis, by ICP-OES	99.993%
Content of Arsenic, Cadmium, Mercury, Lead ppm, by ICP-OES	None Detected
Actual Specific Surface Area (m ² /gm) BET Method	23.3
Actual Equivalent Sphere Diameter (nm) BET Method	25
Signature	
Date	October 8, 2013

MATERIAL SAFETY DATA SHEET								
SECTION 1 - PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION								
PRODUCT NAME: Carbon Coated Silver Nanopowder GENERAL USE: Chemical processing PRODUCT DESCRIPTION: Very fine dark gray to black powder, odorless								
MANUFACTURER'S NAME NCC Nano LLC dba Novacentrix ADDRESS (NUMBER, STREET, P.O. BOX) 200-B Parker Drive, Suite 580 (CITY, STATE AND ZIP CODE) Austin, TX 78728			DATE PREPARED: April 16, 2009 SUPERSEDES: January 27, 2009 TELEPHONE NUMBER FOR INFORMATION (512) 491-9500 EMERGENCY TELEPHONE NUMBER ChemTel Inc. 1-(800) 255-3924 Intl. + 01 (813) 248-0585		Page 1 of 4			
SECTION 2 - HAZARDS IDENTIFICATION								
EMERGENCY OVERVIEW Nanopowders are easily suspended in air and can form a persistent cloud. Breathing nanopowders may cause irritation to the respiratory tract. Chronic inhalation of nanopowders may cause pneumoconiosis, a buildup of scar tissue in the lungs caused by inhalation of dust. Hazard Symbols for this product - Xi Risk Phrases - R36								
POTENTIAL HEALTH EFFECTS INHALATION: Nanopowders are easily suspended in air and can form a persistent cloud. Breathing nanopowders may cause irritation to the respiratory tract. Chronic inhalation of nanopowders may cause pneumoconiosis, a buildup of scar tissue in the lungs caused by inhalation of dust. SKIN: None expected, however, prolonged contact may cause irritation. EYES: Contact with eyes may cause irritation. INGESTION: May cause gastric distress, stomach pains, vomiting and diarrhea.								
CARCINOGENICITY		NTP? No		IARC MONOGRAPHS? No		OSHA REGULATED? No		
SECTION 3 - COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS								
HAZARDOUS COMPONENTS	CAS #	EINECS #	%	OSHA PEL		ACGIH TWA		RQ
				(by weight)	PPM	MG/M3	PPM	
Silver (a,b,c)	7440-22-4	231-131-3	90 - 100		0.01		0.1	1000
Carbon black (d)	1333-86-4	215-609-9	0 - 10		3.5			
(a,c) See Section 15 (b) Indicates that the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) has determined the waste for this chemical is listed as hazardous and must be handled according to regulations in 40 CFR 260-281. (s) California Prop 65, Safe Drinking Water and Toxic Enforcement Act of 1986, chemicals known to the state to cause cancer or reproductive toxicity. A person in the course of doing business must warn others who may consume, come into contact with, or otherwise be exposed to this chemical.								

MATERIAL SAFETY DATA SHEET			
PRODUCT NAME: Carbon Coated Silver Nanopowder April 16, 2009			Page 2 of 4
SECTION 4 - FIRST AID MEASURES			
INHALATION: Remove affected person to fresh air; if symptoms persist seek medical attention.			
SKIN: Remove contaminated clothing; wash affected area with soap and water; launder contaminated clothing before reuse; if irritation persists, seek medical attention.			
EYES: Remove contact lenses. Flush eyes with clear running water for 15 minutes while holding eyelids open; if irritation persists, seek medical attention.			
INGESTION: Give two glasses of water for dilution; DO NOT induce vomiting; seek medical attention.			
SECTION 5 - FIRE FIGHTING MEASURES			
FLASH POINT (METHOD USED) Not applicable	FLAMMABLE LIMITS	LEL: Not applicable	UEL: Not applicable
	AUTOIGNITION TEMPERATURE:	Not determined	NFPA CLASS: None
GENERAL HAZARDS: Products of combustion include metal oxides and metal dust.			
EXTINGUISHING MEDIA Carbon dioxide, dry chemical, water, water spray, chemical foam.			
FIRE FIGHTING PROCEDURES Firefighters must wear full facepiece self - contained breathing apparatus in positive pressure mode.			
UNUSUAL FIRE AND EXPLOSION HAZARDS Product will not burn.			
HAZARDOUS COMBUSTION PRODUCTS Smoke, fumes, oxides of carbon and silver.			
SECTION 6 - ACCIDENTAL RELEASE MEASURES			
STEPS TO BE TAKEN IN CASE MATERIAL IS RELEASED OR SPILLED: Avoid breathing dust. Recover and segregate product for reuse; shovel product into approved container for disposal. Vacuum recovery must use HEPA filter.			
SECTION 7 - HANDLING AND STORAGE			
PRECAUTIONS TO BE TAKEN IN HANDLING AND STORAGE: Keep container closed when not in use; protect containers from abuse; store containers in cool, dry area. Keep this and other chemicals out of reach of children.			
SECTION 8 - EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION			
ENGINEERING CONTROLS The use of local exhaust ventilation and airborne particle collection is recommended. No other special controls are indicated.			
PERSONAL PROTECTION:			
RESPIRATORY PROTECTION: When working with material outside a fume hood, or in any situation where creation of a cloud of nanoparticles is possible, wear a respirator mask with a particulate filter rated by NIOSH as 99.97% efficient. These filters are termed "P100" "R100" and "N100". The P, R, and N refer to oil resistance. Oil resistance should be selected to meet or exceed the requirements of the particular work environment.			
PROTECTIVE GLOVES: Latex or other close fitting gloves			
EYE PROTECTION: Safety glasses. In situations where significant clouds of nanoparticles are likely, unventilated chemical splash goggles. Refer to 29 CFR 1910.133, ANSI Z87.1, or European Standard EN166.			
OTHER PROTECTIVE CLOTHING OR EQUIPMENT: Safety eyebath nearby; lab coat where there is a risk of bulk material being spilled on clothes.			
WORK / HYGIENIC PRACTICES: Use process procedures to minimize dust generation. Minimize body contact with this, as well as all chemical			

MATERIAL SAFETY DATA SHEET				
PRODUCT NAME: Carbon Coated Silver Nanopowder April 16, 2009			Page 4 of 4	
SECTION 15 - REGULATORY INFORMATION				
<p>TSCA (Toxic Substance Control Act) All components of this product are listed on the U.S. Toxic Substances Control Act Chemical Inventory (TSCA Inventory) or are exempted from listing because a Low Volume Exemption has been granted in accordance with 40 CFR 723.50.</p> <p>SARA TITLE III (Superfund Amendments and Reauthorization Act) 311/312 Hazard Categories Immediate health</p> <p>313 Reportable Ingredients: (a) Indicates a toxic chemical subject to annual reporting requirements of Section 313 of the Emergency Planning and Community Right-To-Know Act of 1986 and of 40 CFR 372.</p> <p>CERCLA (Comprehensive Response Compensation and Liability Act) (c) The Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA) has notification requirements for releases or spills to the environment of the Reportable Quantity (RQ for this mixture = 1,000 lbs) or greater amounts, according to 40 CFR 302.</p> <p>California Prop 65, Safe Drinking Water and Toxic Enforcement Act of 1986 There is a reportable chemical present (Carbon black) known to the state of California to cause cancer or reproductive toxicity.</p> <p>CPR (Canadian Controlled Products Regulations) This product has been classified in accordance with the hazard criteria of the Controlled Products Regulations and the MSDS contains all the information required by the Controlled Products Regulations. WHMIS Classification: Not controlled</p> <p>IDL (Canadian Ingredient Disclosure List) Components of this product identified by CAS number and listed on the Canadian Ingredient Disclosure List are shown in Section 3.</p> <p>DSL / NDSL (Canadian Domestic Substances List / Non-Domestic Substances List) Components of this product identified by CAS number are listed on the DSL or NDSL, or are otherwise in compliance with the New Substances Notification (NSN) regulations. Only ingredients classified as "hazardous" are listed in Section 3 unless otherwise indicated.</p> <p>ENINCS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances) Components of this product identified by CAS numbers are on the European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances.</p> <p>WGK Water Quality Index: 3 VtbK Index: Not applicable</p>				
<p>Risk Phrases R36 Irritating to eyes.</p>	<p>SYMBOL(S) REQUIRED FOR LABEL</p> <p>Irritant</p> 	<p>Safety Phrases S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. S36 Wear suitable protective clothing.</p>		
SECTION 16 - OTHER INFORMATION				
Specific toxicity tests have not been conducted on this product. Our hazard evaluation is based on information from similar products, the ingredients, technical literature, and/or professional experience.				
HMIS HAZARD RATINGS		<p>HEALTH 2 * = Chronic Health Hazard 2 = MODERATE FLAMMABILITY 1 0 = INSIGNIFICANT 3 = HIGH PHYSICAL HAZARD 0 1 = SLIGHT 4 = EXTREME</p> <p>PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT E Safety Glasses, Gloves, Dust Respirator</p>		
<p>REVISION SUMMARY: This MSDS has been revised in the following sections: Format update</p>		<p>MSDS Prepared by: Comprehensive Data Base, Inc. P.O. Box 686 Seffner, FL 33583 USA (863) 644 - 3298 www.compdatabase.com or www.msds.cc</p>		
<p>The information contained herein is believed to be accurate but is not warranted to be so. Data and calculations are based on information furnished by the manufacturer of the product and manufacturers of the components of the product. Users are advised to confirm in advance of need that information is current, applicable and suited to the circumstances of use. Vendor assumes no responsibility for injury to vendor or third persons proximately caused by the material if reasonable safety procedures are not adhered to as stipulated in the data sheet. Furthermore, vendor assumes no responsibility for injury caused by abnormal use of this material even if reasonable safety procedures are followed. Any questions regarding this product should be directed to the manufacturer of the product as described in Section 1.</p>				

MATERIAL SAFETY DATA SHEET				
PRODUCT NAME: Carbon Coated Silver Nanopowder April 16, 2009				Page 3 of 4
SECTION 9 - PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES				
APPEARANCE AND ODOR Very fine dark gray to black powder, odorless		VAPOR DENSITY (AIR = 1) Not applicable		
SPECIFIC GRAVITY (WATER = 1) 10.5		EVAPORATION RATE (Water = 1) Not applicable		
SOLUBILITY IN WATER Negligible		% VOLATILE (BY WEIGHT) None		
pH Not applicable		VAPOR PRESSURE Not applicable		
BOILING POINT 3924° F (2162° C)		FREEZING POINT Not determined		
VISCOSITY Dry powder		PARTICLE SIZE < 200 nanometers		
SECTION 10 - STABILITY AND REACTIVITY				
STABILITY UNSTABLE: STABLE: X		CONDITIONS TO AVOID: Avoid generating airborne dust		
INCOMPATIBILITY (MATERIALS TO AVOID): Halogens, strong oxidizers, strong acids, and acetylenic compounds.				
HAZARDOUS DECOMPOSITION OR BYPRODUCTS: Decomposition will not occur if handled and stored properly. In case of a fire, oxides of carbon and metals, hydrocarbons, fumes, and smoke may be produced.				
HAZARDOUS POLYMERIZATION MAY OCCUR: WILL NOT OCCUR: X		CONDITIONS TO AVOID: None		
SECTION 11 - TOXICOLOGICAL INFORMATION				
Hazardous Ingredients		CAS #	EINECS #	LD50 of Ingredient Species and Route
Silver (a,b,c)		7440-22-4	231-131-3	Not established
Carbon black (d)		1333-86-4	215-609-9	440 mg / kg Intravenous - mouse
(a,c) See Section 15				
SECTION 12 - ECOLOGICAL INFORMATION				
No data are available on the adverse effects of this material on the environment. Neither COD nor BOD data are available. Based on the chemical composition of this product it is assumed that the mixture can be treated in an acclimatized biological waste treatment plant system in limited quantities. However, such treatment should be evaluated and approved for each specific biological system. None of the ingredients in this mixture are classified as a Marine Pollutant.				
SECTION 13 - DISPOSAL CONSIDERATIONS				
WASTE DISPOSAL METHOD: Dispose of in accordance with Local, State, and Federal Regulations. Products classified as non - hazardous may become hazardous waste upon contact with other products. Refer to 40 CFR Parts 260-299, "Protection of Environment" for complete waste disposal regulations. Consult your local, state, or Federal Environmental Protection Agency before disposing of any chemicals. According to the European Waste Catalogue, waste codes are application specific and should be assigned by the user based on the application for which the product is used.				
SECTION 14 - TRANSPORT INFORMATION				
PROPER SHIPPING NAME: Non - Hazardous for Transport				
DOT HAZARD CLASS / Pack Group: Not regulated		IATA HAZARD CLASS / Pack Group: Not regulated		
REFERENCE: Not Applicable		IMDG HAZARD CLASS: Not regulated		
UN / NA IDENTIFICATION NUMBER: None		RIDADR Dangerous Goods Code: Not regulated		
LABEL: None Required		UN TDG Class / Pack Group: Not regulated		
HAZARD SYMBOLS: None		Hazard Identification Number (HIN): None		
Note: Transportation information provided is for reference only. Customer is urged to consult 49 CFR 100 - 177, IMDG, IATA, EC, United Nations TDG, and WHMIS (Canada) TDG information manuals for detailed regulations and exceptions covering specific container sizes, packaging materials and methods of shipping.				