



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia e Biociências

CARINE ROESE MORES

IDENTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE
EM LODO DE REATORES QUE APRESENTAM ATIVIDADE
ANAMMOX

Florianópolis

2018

Carine Roese Mores

**IDENTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE
EM LODO DE REATORES QUE APRESENTAM ATIVIDADE
ANAMMOX**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do grau
de Mestre em Biotecnologia e
Biociências

Orientador: Prof. Dr. Admir
José Giachini

Coorientador: Prof. Dr. Airton
Kunz

Florianópolis

2018

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

Roese Mores, Carine

Identificação da Comunidade Microbiana Presente em Lodo
de Reatores que Apresentam Atividade Anammox / Carine
Roese Mores ; orientador, Admir Giachini, coorientador,
Airton Kunz, 2018.

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

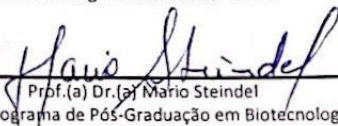
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Anammox. I.
Giachini, Admir. II. Kunz, Airton. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

"Identificação da comunidade microbiana presente em lodo de reatores que apresentam atividade Anammox"

Por

Carine Roese Mores

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (007/2018/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

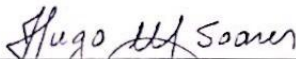


Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

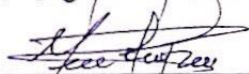
Banca examinadora:



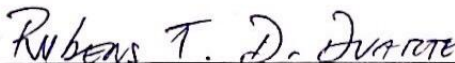
Dr.(a) Admir José Giachini (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Hugo Moreira Soares (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Márcio José Rossi (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Rubens Tadeu Delgado Duarte (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 06 de abril de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão, que estiveram sempre ao meu lado. Agradeço por todos os ensinamentos e pela forma que vocês me ensinaram e me ajudam a levar a vida. Arnaldo, Carien e Caio, amo vocês e sou muito grata por tudo.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Airton Kunz e Prof. Dr. Admir Giachini, por todo conhecimento compartilhado.

Ao Dr. Maurício Cantao, por ter sido parte fundamental na realização deste trabalho. Agradeço de coração por toda a paciência e por compartilhar um pouco do teu conhecimento comigo! Agradeço também à Dra. Adriana Ibelli, pela contribuição prática e teórica na realização deste trabalho. Vocês dois são pessoas e profissionais incríveis e eu sou extremamente grata pelo tempo que passei ao lado de vocês. Agradeço também aos demais colegas da sanidade que muito me ajudaram e me receberam sempre sorrindo.

À Prof. Dra. Marina De Prá, por ter sido fonte de inspiração desde o meu trabalho de conclusão de curso e por ter compartilhado tanto conhecimento comigo desde então.

Aos demais colegas do LEAA, por terem dividido comigo grande parte dos meus dias nesses anos e por toda a ajuda. Agradeço também aos colegas da pós graduação e também aos colegas da faculdade, por terem feito dos meus dias de UFSC os melhores possíveis!

Aos professores da UFSC pelas aulas lecionadas e pelo conhecimento compartilhado. Em especial aos profs. Rubens Duarte, Marcio Rossi, Diogo Robl e Edmundo Grisard.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa e aos demais órgãos, pelo apoio financeiro concedido à pesquisa.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Suínos e Aves, pela estrutura disponibilizada para a realização do trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGGBB), pela contribuição para o aprendizado.

À minha família, tios, primos e avós, que não contribuíram diretamente com este trabalho, mas estiveram ao meu lado nesses anos. Agradeço também aos meus amigos, por cada momento que compartilhei com todos vocês. Em especial à minha dupla preferida da faculdade, Fabi e Lu. Agradeço a ti também, Betto, por ter estado ao meu lado nessa reta final, me apoiando e incentivando.

E a todos que participaram da minha vida nesses anos. Gratidão!

"Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós."

Antoine de Saint-Exupéry

*“Experiência não é o que acontece com um homem;
é o que um homem faz com o que lhe acontece”*

Aldous Huxley

RESUMO

A agroindústria brasileira tem crescido de forma significativa nos últimos anos. Esse crescimento traz consigo um alto volume de efluentes gerados com um grande aporte de matéria orgânica e nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Quando esses efluentes não são devidamente tratados, apresentam um alto potencial poluidor, impactando no meio ambiente e na saúde humana e de outros animais. Dessa forma, diversos processos de remoção de nutrientes vêm sendo estudados. Processos de desamonificação que combinam a nitrificação parcial com o processo anammox vêm ganhando posição de destaque no cenário mundial e diversos estudos são desenvolvidos para otimização dos mesmos. Os microrganismos responsáveis pelo processo são de suma importância, e os estudos sobre caracterização dos consórcios microbianos em reatores são recentes e se tornado frequentes devido ao avanço de técnicas moleculares e a necessidade de entender e otimizar a comunidade de microrganismos em reatores operacionais. O presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar o lodo anammox presente em três reatores com diferentes condições experimentais, visando determinar a comunidade microbiana nesses ambientes e entender como elas se comportam frente a mudanças operacionais. Foram coletadas amostras de dois reatores exclusivamente anammox (1 e 2) e de um reator de desamonificação (3). Realizou-se a extração de DNA e amplificação do material genético para sequenciamento de amplicons 16S em na plataforma Illumina MiSeq. Reator 1, foi identificado dois gêneros anammox *Ca. Jettenia*, com uma abundância relativa de 7% e *Ca. Brocadia* (3%), além dos filos *Chloroflexi* (27%), *Proteobacteria* (24%), *Chlorobi* (20%) e *Acidobacteria* (9%). No Reator 2 foram os mesmos filos não anammox, e os mesmos dois gêneros anammox, porém em abundâncias relativas diferentes *Ca. Brocadia* (8%) e *Ca. Jettenia* (3%). Já no Reator 3, foi identificado apenas o gênero anammox *Ca. Jettenia* (10%), acompanhado dos mesmos filos não anammox identificados nos reatores 1 e 2. O lodo do Reator 1 serviu de inóculo para os reatores 2 e 3, indicando que mudanças nas condições operacionais dos reatores influenciam na dinâmica da comunidade microbiana.

ABSTRACT

Brazilian agribusiness has shown a significant growth in recent years. With it, high volumes of effluents are generated, with a large supply of organic matter and nutrients, mainly nitrogen and phosphorus. When these effluents are not properly treated, they present a high polluting potential, impacting the environment and human health and other animals. Several processes of nutrient removal have been studied. Deamonification processes that combine partial nitration with the anammox process have been gaining a prominent position in the world scenario and several studies are developed to optimize them. The microorganisms responsible for the process are of great importance and studies on the characterization of microbial consortia in reactors are recent and have become frequent due to the advance of molecular techniques and the need to understand and optimize the community of microorganisms in operational reactors. The present study aimed to identify and characterize the anammox sludge present in four reactors with different experimental conditions, aiming to determine the microbial community in these environments and understand how they behave with operational changes. Samples were collected from two reactors exclusively anammox (1 and 2) and one deamonification reactor (3). DNA extraction and amplification of the genetic material were performed for the sequencing of 16S amplicons on the Illumina MiSeq platform. In Reactor 1, two genera anammox *Ca. Jettenia* were identified, with a relative abundance of 7% and *Ca. Brocadia* (3%), besides the *Chloroflexi* phyla (27%), *Proteobacteria* (24%), *Chlorobi* (20%) and *Acidobacteria* (9%). In Reactor 2 were the same phyla not anammox, and the same two genera anammox, but in different relative abundances *Ca. Brocadia* (8%) and *Ca. Jettenia* (3%). In Reactor 3, only the genus anammox *Ca. Jettenia* (10%) was identified, accompanied by the same non-anammox phyla identified in reactors 1 and 2. Sludge from Reactor 1 served as inoculum for reactors 2 and 3, indicating that changes in reactor operating conditions influence the dynamics of the microbial community.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo clássico do nitrogênio com os processos de fixação, nitrificação e desnitrificação.....	29
Figura 2 – Ciclo biológico do nitrogênio, com processo de nitrificação, desnitrificação e anammox.....	30
Figura 3 – Provável rota metabólica do processo anammox. NiR, nitrito redutase, HH, hidrazina hidrólase, HZO, hidrazina oxidoreductase.....	32
Figura 4 – Esquema do processo de NP + ANAMMOX.....	38
Figura 5 – Esquema do processo de desamonificação.....	39
Figura 6 – A: lodo granular proveniente de um processo de desamonificação de único estágio; B: micrografia FISH (do inglês <i>fluorescence in situ hybridization</i>) de um grânulo anammox, com setas indicando a disponibilização de nitrito das BOA para as anammox e conversão do nitrito e amônia a nitrogênio gasoso. Bactérias oxidadoras de amônio em vermelho e anammox em verde.....	40
Figura 7 – Gene rRNA 16S desenhado com base na sequência de <i>E. coli</i> . Marcações em azul – regiões variáveis entre gêneros ou espécies. Espaços em branco – sequência conservada no domínio Bacteria.....	42
Figura 8 – Aspecto visual das amostras de lodo anammox no momento das coletas de biomassa nos diferentes reatores.....	52
Figura 9 – Acompanhamento temporal do Reator 2.....	53
Figura 10 – Abundância relativa de microrganismos dos reatores com base nos dados obtidos.....	56
Figura 11 – Curvas de rarefação a 3% referentes a cada reator nos dados obtidos.....	57
Figura 12 – Abundância de microrganismos no Reator 1 com base nos resultados obtidos.....	58

Figura 13 – Abundância de microrganismos no Reator 2 com base nos resultados obtidos.....	62
Figura 14 – Abundância de microrganismos no Reator 3 com base nos resultados obtidos.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volume anual de dejetos líquidos produzidos em sistemas especializados de produção de suínos no Estado de Santa Catarina.....	23
Tabela 2 – Espécies anammox já descritas na literatura.....	33
Tabela 3 – Principais características dos reatores acompanhados.....	46
Tabela 4 – Eficiência de remoção de nitrogênio e concentração das formas nitrogenadas na entrada e na saída dos reatores período da coleta.....	51
Tabela 5 – Número de sequências totais do sequenciamento e número de sequências obtidas após controle de qualidade e remoção de erros.....	54
Tabela 6 – Número de sequências e OTUs observadas e índices de diversidade calculados.....	55
Tabela 7 – Principais microrganismos encontrados nos diferentes reatores operacionais.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal

ANAMMOX – *Anaerobic Ammonium Oxidation*

BOA – Bactérias Oxidadoras de Amônio

BON – Bactérias Oxidadoras de Nitrito

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

FISH – *Fluorescence In Situ Hybridization*

NP – Nitritação Parcial

TRH – Tempo de Retenção Hidráulica

SPACs – Sistemas de Produção de Animais Confinados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVO GERAL.....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1 AGROINDÚSTRIA E O MEIO AMBIENTE.....	23
3.2 PROBLEMA AMBIENTAL DO NITROGÊNIO.....	25
3.3 PROCESSOS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO.....	27
3.3.1 NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO.....	28
3.3.2 OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DO ÍON AMÔNIO (ANAMMOX).....	30
3.3.2.1 <i>Microrganismos com atividade anammox</i>	32
3.3.3 PROCESSO DE NITRITAÇÃO PARCIAL (NP).....	36
3.3.4 PROCESSO DE DESAMONIFICAÇÃO.....	37
3.4 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA.....	41
3.4.1 ANÁLISES BIONFORMÁTICAS DE DADOS.....	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 LOCAL DE ESTUDO.....	46
4.2 SISTEMA EXPERIMENTAL.....	46
4.3 MONITORAMENTO ANALÍTICO.....	47
4.3.1 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO.....	47
4.4 COLETA DE AMOSTRAS.....	47

4.5 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO.....	48
4.6 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO.....	51
5.2 SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	54
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA.....	55
5.3.1 REATOR 1.....	58
5.3.1 REATOR 2.....	62
5.3.1 REATOR 3.....	64
5.3.3 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS ENCONTRADOS.....	65
6 CONCLUSÃO.....	68
7 PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTUROS.....	68
8 REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura desponta como um dos grandes pilares do agronegócio brasileiro. A produção de suínos em 2016 chegou a 3,7 milhões de toneladas, colocando o Brasil como quarto maior produtor mundial de carne suína (ABPA, 2017). Apesar da grande importância econômica e social que representa, esse setor exerce uma pressão negativa sobre o meio ambiente quando seus efluentes não são corretamente tratados ou manejados.

Impactos ambientais causados pela suinocultura foram potencializados com a adoção dos Sistemas de Produção de Animais em Confinamento (SPACs), modelo de produção que concentra um grande número de animais em pequenas áreas, visando melhoria nos controles sanitários e redução dos custos de produção (KUNZ *et al.*, 2009). Isso porque nessa atividade produtiva é gerado um grande volume de efluente com uma alta concentração de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo), que são potenciais poluidores de ecossistemas aquáticos e terrestres (FAO, 2006; KUNZ *et al.*, 2009).

O nitrito quando ingerido pode combinar-se com aminas secundárias provenientes da dieta alimentar, formando nitrosaminas que apresentam poder mutagênico e carcinogênico (BITTON, 2005). Além disso, a amônia, pode causar a morte de diversas espécies da comunidade aquática pela sua toxicidade, além de diminuir o oxigênio dissolvido e acelerar o processo natural de eutrofização da água. Dentre outros problemas, pode-se destacar ainda a presença de maus odores nos locais de disposição e o provável aparecimento de vetores de doenças como insetos e roedores (DE LA TORRE *et al.*, 2000).

É crescente a exigência por parte dos órgãos ambientais quanto aos critérios de manejo de resíduos. A resolução n° 430 de 2011 do CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) cita no Artigo 27 que “as fontes potencial ou efetivamente poluidoras dos recursos hídricos deverão buscar práticas de gestão de efluentes com vistas ao uso eficiente da água, à aplicação de técnicas para redução da geração e melhoria da qualidade de efluentes gerados e, sempre que possível e adequado, proceder à reutilização” e que os responsáveis pelas fontes poluidoras deverão realizar o automonitoramento para controle e acompanhamento periódico dos efluentes lançados nos corpos receptores, com base em amostragem representativa dos mesmos e apresentar anualmente a Declaração de Carga Poluidora, referente ao ano anterior.

Para remoção de nitrogênio, podem-se utilizar processos físico-químicos e biológicos (KUNZ *et al.*, 2009; VIVIAN *et al.*, 2010). Os processos físico-químicos apresentam um alto custo de tratamento. Sendo assim, a remoção de compostos nitrogenados por sistemas biológicos tem sido preferencialmente empregada (ZHU *et al.*, 2008; METCALF & EDDY, 2003), pois atingem uma alta eficiência na remoção de compostos nitrogenados com menor custo operacional quando comparados aos processos físico-químicos (EPA, 1993).

A estratégia biológica convencional para remoção de nitrogênio é a nitrificação e posterior desnitrificação. Contudo, esse processo exige uma grande quantidade de oxigênio e alcalinidade para completar o ciclo de remoção. Dessa forma, as pesquisas visam a otimização das estratégias de tratamento existentes e buscas por novos processos. Em 1995, foi descoberta a existência de um novo segmento do ciclo do nitrogênio, conhecido como oxidação anaeróbia do amônio (ANAMMOX) (MULDER

et al., 1995). Nesse processo, o íon amônio é oxidado diretamente a nitrogênio gasoso, utilizando nitrito como aceitor final de elétrons e com uma pequena produção de nitrato. O processo anammox atinge elevada porcentagem de remoção de nitrogênio, chegando a cargas aplicadas até 100 vezes maiores quando comparado ao processo convencional (TANG *et al.*, 2011; CASAGRANDE *et al.*, 2013). Tendo em vista que o efluente agroindustrial apresenta apenas nitrogênio amoniacal em sua composição, esse, precisa passar por um pré tratamento antes de entrar em um reator anammox. A nitrificação parcial (NP) consiste na oxidação de 50% do nitrogênio amoniacal a nitrito, e havendo essa conversão, o efluente se torna apto a entrar em um reator com atividade anammox, afim de completar o ciclo de remoção de nitrogênio (ZHANG *et al.*, 2011).

Verificou-se a possibilidade de combinar o processo de nitrificação parcial (NP) com o processo anammox em um mesmo reator. Esse processo, denominado desamonificação, consiste na oxidação parcial de amônia a nitrito pela atividade das bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e na subsequente conversão do nitrito produzido e do amônio residual à nitrogênio gasoso pela atividade das bactérias anammox. Assim, tem-se uma completa remoção de nitrogênio via nitrito com utilização de carbono inorgânico como fonte para o crescimento celular (processo completamente autotrófico) em um único reator, reduzindo os custos operacionais (STROUS *et al.*, 1998; JETTEN *et al.*, 2001).

A Embrapa Suínos e Aves em conjunto com o Departamento de Engenharia Química da UFSC, iniciou suas pesquisas com o processo anammox em 2005 (SCHIERHOLT NETO *et al.*, 2006; KUNZ *et al.*, 2008). Os estudos direcionados para o processo de desamonificação em duas etapas iniciaram-se em 2011 com a otimização do processo de

nitritação parcial (PRÁ *et al.*, 2012b) e aplicação desse efluente em reatores anammox (PRÁ *et al.*, 2012a). Desde 2013 a desamonificação em uma única etapa vêm sendo estudada e otimizada pelo grupo utilizando digestatos da suinocultura (DE PRÁ *et al.*, 2015; SCUSSIATO *et al.*, 2015; CHINI *et al.*, 2016; DE PRÁ *et al.*, 2016).

O presente estudo teve como objetivo identificar a comunidade microbiana presente em três reatores com diferentes condições operacionais, visando caracterizar o lodo de reatores que apresentam atividade anammox para que seja possível a otimização do processo.

2 OBJETIVO GERAL

Identificar a comunidade microbiana em três reatores com atividade anammox através de sequenciamento de segunda geração.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o lodo anammox e entender o comportamento do consórcio microbiano frente a diferentes condições experimentais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A AGROINDÚSTRIA E O MEIO AMBIENTE

O agronegócio brasileiro tem ocupado lugar de destaque no âmbito econômico e social do país (GASQUES, 2004; PALHARES, 2011). Nesse contexto, a suinocultura desponta como um dos pilares do setor, que juntamente com a avicultura, coloca o país em posição de destaque mundial na produção de proteína animal (CIAS, 2018).

O modelo de produção atual (SPACs), caracterizado pela criação intensiva e em confinamento, foi decisivo para alavancar a produção, pois apresenta uma alta produtividade e regularidade de produção. Contudo, como há concentração de um grande número de animais em áreas reduzidas, há também geração de um grande volume de efluentes ricos em matéria orgânica e nutrientes, o que aumenta ainda mais os riscos de contaminação ambiental das regiões produtoras (KUNZ *et al.*, 2005), sendo o principal desafio de manejo da atividade.

O grande volume de resíduos gerados é resultante do alto desperdício de água nas instalações de produção animal (PERDOMO, 2001). A Tabela 1 apresenta o volume de dejetos líquidos gerados por dia pela suinocultura de acordo com a fase produtiva do suíno.

Tabela 1 - Volume anual de dejetos líquidos ($L \cdot animal^{-1} \cdot dia^{-1}$) produzidos em sistemas especializados de produção de suínos no Estado de Santa Catarina.

Modelos de Sistema de Produção de Suínos	Volume Dejetos (L.animal⁻¹.dia⁻¹)
Ciclo Completo (CC)	41,7
Unidade de Produção de Leitões (UPL)	22,8
Unidade de Produção de Desmamados (UPD)	16,2
Crechários (CR)	2,3
Unidade de Terminação (UT)	4,5

Fonte: FATMA, 2014 (adaptado).

Por um longo período, utilizou-se a técnica de estocagem dos resíduos para posterior disposição nos solos como biofertilizantes, devido ao baixo custo de manejo e a possível utilização dos nutrientes para fertilização do solo (LIN *et al.*, 2016). Esse procedimento, entretanto, requer muito cuidado na hora da disposição, pois deve se considerar a capacidade específica de cada região, o tipo de solo e de plantas cultivadas, por um balanço de massa solo x planta para que se descarte a possibilidade de contaminação dos recursos hídricos (YAN *et al.*, 2016).

A contaminação de águas subterrâneas é causada majoritariamente por compostos como fosfatos, nitratos e nitritos, que por possuírem como característica alta solubilidade, percolam facilmente o solo atingindo lençóis e depósitos profundos (KRAPAC *et al.*, 2002).

Quando atingem em corpos receptores naturais, os dejetos provenientes da agroindústria podem ser extremamente nocivos ao meio ambiente, pois são disseminadores de microrganismos potencialmente patogênicos, aceleram o processo natural de eutrofização das águas e podem influenciar fortemente a dinâmica do oxigênio, diminuindo sua

concentração dissolvida no meio (BITTON, 2005), podendo causar a morte de diversas espécies da comunidade aquática (METCALF; EDDY, 2003). Podem também impactar na microbiota natural, pelo aporte de desinfetantes e antibióticos que apresentam, além de provocar o aparecimento de vetores de contaminação e maus odores, dentre outros problemas (BURKHOLDER *et al.*, 2007; HRIBAR, 2010).

Devido ao crescimento da agroindústria nos últimos anos, o volume de águas residuárias gerados também é crescente. Dessa maneira, a poluição por efluentes agropecuários vem se agravando nos centros produtores, já que o armazenamento e uso como biofertilizante podem exceder a capacidade de suporte do solo. Sendo assim, a busca é sempre por alternativas que tratem os resíduos, não somente para mitigar o impacto ambiental causado, mas também para que se proceda a reutilização do efluente tratado, diminuindo assim o consumo de água nos centros produtivos (SEGANFREDO, 2007) e atendendo a legislação ambiental.

3.2 O PROBLEMA AMBIENTAL DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é o principal constituinte de proteínas e ácidos nucleicos, sendo um elemento essencial para vida. É predominantemente encontrado como nitrogênio gasoso (N_2), sendo o gás mais abundante da atmosfera (79%) (BITTON, 2005). Contudo, está presente na natureza sob diversas formas e diferentes estados de oxidação e as espécies químicas de maior relevância são nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal (NH_3/NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (ZHU *et al.*, 2008; CERVANTES, 2009).

No ciclo do nitrogênio, o N_2 , que não está diretamente disponível para a biota terrestre, pode ser convertido a NH_3 por organismos

procariotos, como bactérias e cianobactérias, em um processo denominado fixação do nitrogênio (BERNHARD, 2010). O nitrogênio amoniacal pode ser então assimilado por organismos fixadores ou oxidado a nitrito e posteriormente a nitrato. A concentração das duas formas de nitrogênio amoniacal, NH_3 e NH_4^+ , é definida pelo pH e temperatura da solução aquosa em que se encontram. O equilíbrio das duas formas ocorre no pH 9,25. Em valores de pH superiores a 9,25 o equilíbrio é deslocado para formação de NH_3 , enquanto que em valores inferiores a 9,25 há a predominância do íon NH_4^+ (METCALF e EDDY, 2003).

Nos dejetos frescos da agropecuária, o nitrogênio presente está predominantemente combinado sob a forma de proteína e ureia. Entretanto, esse é primeiramente convertido em amônia, e quando em condições aeróbias, a nitrito e, subsequentemente, a nitrato, sua forma mais estável e oxidada (METCALF e EDDY, 2003).

Na questão ambiental, concentrações elevadas de nitrogênio amoniacal em corpos hídricos podem influenciar fortemente a dinâmica do oxigênio, reduzindo sua concentração dissolvida no meio, tendo em vista que para oxidar 1 mg de NH_3 são necessários 4,6 mg de O_2 (CERVANTES, 2009), acelerando o processo natural de eutrofização das águas. O nitrito, por sua vez, quando ingerido pode combinar-se com aminas secundárias provenientes da dieta alimentar, formando nitrosaminas que são potencialmente carcinogênicas e mutagênicas (BITTON, 2005).

A Resolução nº 430 de 2011 do CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) estipula, por exemplo, 20 mg L⁻¹ de nitrogênio amoniacal como concentração máxima e limite de lançamento em corpos hídricos. São crescentes as exigências quanto aos critérios de manejo de dejetos,

acarretando na busca pela evolução dos processos de tratamentos de efluentes, para que se reduza de forma satisfatória a concentração de nutrientes (GRADY *et al.*, 1999), mitigando os impactos ambientais causados.

3.3 PROCESSOS DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

Para remoção de nitrogênio, podem-se utilizar processos físico-químicos e biológicos (KUNZ *et al.*, 2009; VIVIAN *et al.*, 2010). Os processos físico-químicos apresentam um alto custo de tratamento. Sendo assim, a remoção de compostos nitrogenados por sistemas biológicos tem sido preferencialmente empregada (METCALF & EDDY, 2003; ZHU *et al.*, 2008), pois aqueles processos atingem uma alta eficiência na remoção de espécies nitrogenadas com menor custo operacional quando comparados aos processos físico-químicos (EPA, 1993). Os processos biológicos de tratamento consistem de diferentes estágios onde constrói-se um cenário favorável para o desenvolvimento de comunidades microbianas específicas.

A estratégia biológica convencional para remoção de nitrogênio é a nitrificação e posterior desnitrificação. A nitrificação é uma etapa aeróbia e autotrófica, onde o nitrogênio amoniacal é primeiramente oxidado a nitrito e posteriormente oxidado a nitrato. O nitrato formado é então convertido a nitrogênio gasoso na desnitrificação, em uma etapa anóxica (na ausência de oxigênio, mas na presença de nitrato como acceptor final de elétrons) e heterotrófica (SCHIMIDELL; REGINATTO, 2005). Contudo, esse processo demanda uma grande quantidade de oxigênio e alcalinidade para completar o ciclo de remoção e é eficiente em águas residuais com baixas, concentrações de nitrogênio (AHN, 2006).

3.3.1 NITRIFICAÇÃO E DESNITRIFICAÇÃO

A oxidação de amônia a nitrito (nitritação) é realizada pelas bactérias oxidadoras de amônia (BOA), principalmente pelas espécies pertencentes ao gênero *Nitrosomonas* (Equação 1) (MELTCALF & EDDY 2003). Já a oxidação de nitrito a nitrato (nitratação) é realizada pelas bactérias oxidadoras de nitrito (BON), principalmente pelas espécies que pertencem ao gênero *Nitrobacter* (Equação 2) (ZOPPAS *et al.*, 2016). A conversão amônia, a nitrito, e a nitrato é denominada nitrificação.



O processo de nitrificação ocorre em aerobiose, ou seja, o oxigênio é usado como acceptor de elétrons. As BOA e as BON são autótrofas e quimiolitotróficas, utilizando dióxido de carbono (CO_2) como fonte de carbono, e oxidando compostos inorgânicos para obtenção de energia (MARIN *et al.*, 2016).

No processo de desnitrificação, o íon nitrato é convertido a nitrogênio gasoso pela atividade de bactérias heterotróficas que utilizam nitrito ou nitrato como acceptor de elétrons e matéria orgânica como fonte de carbono e energia. A desnitrificação ocorre em quatro estágios, como demonstrado na Equação 3 (ZOPPAS *et al.*, 2016).



Os principais microrganismos envolvidos no processo de desnitrificação são pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Paracoccus*, *Thiobacillus* e *Propoonibacterius*. Estes, utilizam o

nitrato e o nitrito como receptor de elétrons, ao contrário das bactérias nitrificantes que usam o oxigênio. Além disso, são heterotróficos, assim assimilam carbono de fontes orgânicas para suprimento das necessidades metabólicas (CIUDAD, 2007).

Os processos de fixação (conversão de N_2 a NH_4), nitrificação e desnitrificação, que compreendem o ciclo do nitrogênio, estão representados simplificadaamente na Figura 1.

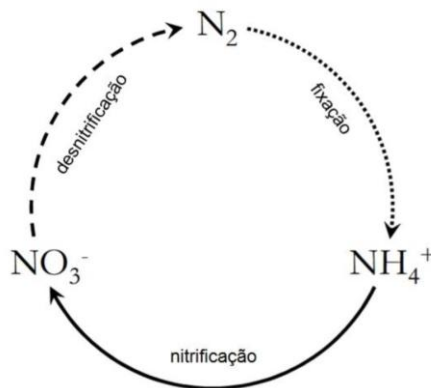


Figura 1 – Ciclo clássico do nitrogênio com os processos de fixação, nitrificação e desnitrificação.

Fonte: (VAN DER STAR, 2008, adaptado).

Para efluentes muito concentrados, como o efluente da suinocultura, o sistema operacional convencional apresenta dificuldades quanto ao dimensionamento e operação. Isso conduz a novas pesquisas que visam melhorar a eficiência das estratégias de remoção de nitrogênio e reduzir custos para implementação. Essa melhoria pode se dar por técnicas já conhecidas ou por novas técnicas, novos processos e até mesmo microrganismos que sejam capazes de transformar a amônia em nitrogênio

gasoso (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ; GONZALEZ-LOPEZ, 2016; JETTEN *et al.*, 2002). Nesse aspecto, busca-se preferencialmente processos que oxidem o amônio utilizando o nitrito e não o nitrato comoceptor final de elétrons, visando a economia de oxigênio no processo (SCHMIDELL *et al.*, 2007).

3.3.2 OXIDAÇÃO ANAERÓBIA DO ÍON AMÔNIO (ANAMMOX)

Mulder *et al.* (1995) descobriram a existência de um novo segmento do ciclo do nitrogênio, conhecido como oxidação anaeróbia do amônio (ANAMMOX). O processo, ilustrado na Figura 2, oxida o íon amônio diretamente a nitrogênio gasoso, na ausência de oxigênio e utilizando nitrito comoceptor final de elétrons.

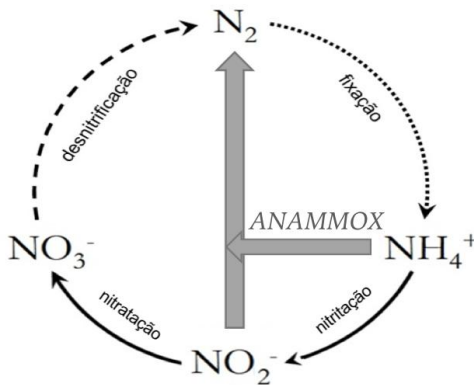
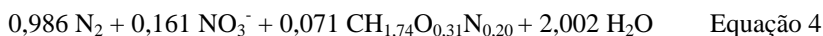
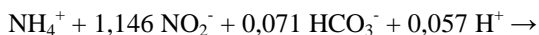


Figura 2 – Ciclo biológico do nitrogênio, com processo de nitrificação, desnitrificação e anammox.

Fonte: (VAN DER STAR, 2008, adaptado).

O processo anammox é tão favorável quanto o de nitrificação aeróbia, pois esses apresentam a mesma ordem de grandeza de energia livre. A estequiometria da oxidação anaeróbia do íon amônio está apresentada na

Equação 4 (LOTTI *et al.*, 2014). O crescimento das bactérias anammox pelo consumo de nitrito e amônia resulta na produção de nitrato, pois esses microrganismos oxidam parte do nitrito a nitrato, gerando equivalentes de redução para fixação do CO₂ e consequente crescimento da biomassa.



Os detalhes bioquímicos do processo anammox ainda não estão completamente elucidados, entretanto, a provável rota metabólica está ilustrada na Figura 3. Nela, o nitrito (NO₂) é primeiramente reduzido a óxido nítrico (NO) pela enzima nitrito redutase. Subsequentemente, o óxido nítrico reage com a amônia (NH₃) produzindo hidrazina (N₂H₄) pela atividade da enzima hidrazina hidrolase. A hidrazina é então oxidada a nitrogênio gasoso (N₂) e elétrons H⁺, pela enzima hidrazina oxidoreductase. Alguns elétrons gerados nessa etapa entram na cadeia transportadora de elétrons e geram uma força próton motriz e ATP pela ATPase, enquanto outros retornam ao sistema para alimentar o consumo de elétrons das etapas anteriores (JETTEN *et al.*, 2009; MADIGAN *et al.*, 2010).

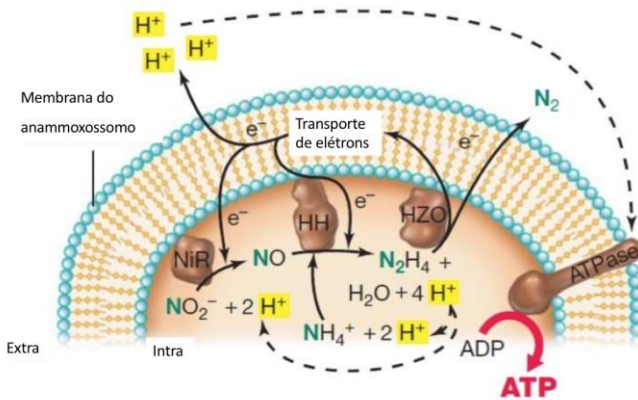


Figura 3 – Provável rota metabólica do processo anammox. NiR, nitrito redutase, HH, hidrazina hidrolase, HZO, hidrazina oxidoreductase.

Fonte: (MADIGAN *et al.*, 2010, adaptado).

3.3.2.1 *Microorganismos com atividade anammox*

Análises genômicas mostraram que as bactérias responsáveis pelo processo anammox formam um grupo monofilético que pertence ao filo Planctomycetes. Estão inseridas na classe Planctomycetia, ordem *Candidatus* Brocadiales e família *Candidatus* Brocadiaceae (PEREIRA *et al.*, 2017). O termo *Candidatus* é utilizado pois esses microrganismos ainda não foram isolados e cultivados por métodos clássicos de microbiologia.

As espécies já descritas na literatura estão apresentadas na Tabela 2. A maioria dos gêneros descritos até agora foram detectados em lodos de sistemas de tratamento e aclimatados e enriquecidos em reatores com diferentes configurações.

Tabela 2 – Espécies anammox já descritas na literatura.

Gênero	Espécie	Referência
<i>Candidatus</i> Kueningenia	<i>Ca.</i> Kueningenia stuttgartiensis	SCHIMID <i>et al.</i> , 2000
<i>Candidatus</i> Brocadia	<i>Ca.</i> Brocadia anammoxidans	STROUS <i>et al.</i> , 1999
	<i>Ca.</i> Brocadia fulgida	KARTAL <i>et al.</i> , 2008
	<i>Ca.</i> Brocadia sinica	HU <i>et al.</i> , 2010
	<i>Ca.</i> Brocadia brasiliensis	ARAUJO <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ca.</i> Brocadia caroliniensis	VANOTTI <i>et al.</i> , 2011
<i>Candidatus</i> Anammoxoglobus	<i>Ca.</i> Anammoxoglobus propionicus	KARTAL <i>et al.</i> , 2007
	<i>Ca.</i> Anammoxoglobus sulfate	LIU <i>et al.</i> , 2008
<i>Candidatus</i> Jettenia	<i>Ca.</i> Jettenia asiatica	QUAN <i>et al.</i> , 2008
	<i>Ca.</i> Jettenia caeni	ALI <i>et al.</i> , 2015
	<i>Ca.</i> Jettenia moscovienalis	NIKOLAEV <i>et al.</i> , 2015
<i>Candidatus</i> Scalindua	<i>Ca.</i> Scalindua brodae e wagneri	SCHMID <i>et al.</i> , 2003
	<i>Ca.</i> Scalindua sorokonii e arabica	WOEBKEN <i>et al.</i> , 2008
	<i>Ca.</i> Scalindua sinooifield	LI <i>et al.</i> , 2010
	<i>Ca.</i> Scalindua zhenghei	HONG <i>et al.</i> , 2011

	<i>Ca. Scalindua marina</i>	BRANDSMA <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ca. Scalindua richardsii</i>	FUCHSMAN <i>et al.</i> , 2012
	<i>Ca. Scalindua profunda</i>	VAN DER VOSENBERG <i>et al.</i> , 2013
<i>Candidatus Anammoximicrobium</i>	<i>Ca. Anammoximicrobium moscowii</i>	KHRAMENKOV <i>et al.</i> , 2013
<i>Candidatus Brazilis</i>	<i>Ca. Brazilis concordiensis</i>	VIANCELLI <i>et al.</i> 2011

Fonte: (PEREIRA *et al.*, 2017, adaptado).

Todas as espécies já descritas são anaeróbias, quimiolitotróficas e operam sob condições anóxicas. Alguns estudos conseguiram observar e avaliar a capacidade de algumas espécies do gênero *Ca. Brocadia* de utilizar compostos orgânicos (acetato, propionato, metilaminas) para crescimento, predominando e suprimindo outras bactérias anammox (KARTAL *et al.*, 2008). Feng e colaboradores (2017), reportaram em seu estudo que bactérias do gênero *Ca. Brocadia* aumentaram sua abundância e suprimiram outros gêneros anammox em um reator mixotrófico.

As bactérias anammox apresentam características bem peculiares, como presença de três compartimentos celulares. O anammoxossomo é o compartimento celular mais interno, e nele, ou próximo a ele, que se encontra grandes concentrações de citocromo *c*, que corresponde a aproximadamente 30% do complexo proteico (LOTTI *et al.*, 2014), indicando que a rota metabólica do processo anammox ocorre no anammoxossomo (VAN NIFTRIK *et al.*, 2008). O citocromo *c* é a molécula

responsável pela transferência de elétrons durante a reação, que confere à biomassa a coloração vermelha característica. Dessa forma, quanto maior a atividade metabólica das bactérias, maior a concentração de citocromo c intracelular, resultando numa coloração mais avermelhada da biomassa. Esse fato pode ser observado quando se reduz por exemplo, o tempo de retenção hidráulico de reatores anammox, pois quanto menor o TRH, maior a vazão de entrada de meio de cultura, e portanto, mais meio de cultura circula pelo reator.

Esses microrganismos apresentam morfologia de cocos com diâmetro menor que $1\mu\text{m}$ (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004), e têm tendência à formação de grânulos. Os grânulos formados são resultados da excreção de exopolissacarídeos (EPS) e de interações com outros grupos de bactérias que possuem propriedades que permitem a formação e a anexação de outros microrganismos para formação de grânulos. A formação de grânulos confere maior resistência a esses microrganismos, permitindo a operação confiável em sistemas compactos caracterizados por uma grande concentração de biomassa e velocidade de conversão em até $20\text{-}70\text{ kgN d}^{-1}\text{ m}^{-3}$ (CASAGRANDE *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2011).

Jetten *et al.* (2001) relataram que bactérias anammox tem tempo de geração variando de 9 a 11 dias, o que é bastante longo quando comparado a outros microrganismos. Tang *et al.* (2010) encontraram um valor de 4,8 dias para duplicação, contando com o melhoramento das condições operacionais de reator, diminuindo o TRH. Em 2015, Lotti e seu grupo trabalharam com o gênero *Ca. Brocadia* e encontraram uma velocidade de crescimento máxima de $0,33\text{ d}^{-1}$, o que corresponde a um tempo de duplicação de 2,1 dias. Em 2017, Zhang e colaboradores trabalharam com os gêneros *Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia* e encontraram

velocidades de crescimento máximas de $0,34 \text{ d}^{-1}$ e $0,18 \text{ d}^{-1}$, o que corresponde a tempos de duplicação de 2,1 dias e 3,9 dias, respectivamente.

Os microrganismos com atividade anammox são ativos na ausência de O_2 , o que torna o oxigênio dissolvido (OD) um parâmetro crítico para processos anammox. Inicialmente, Strous e colaboradores (1998) reportaram que as bactérias anammox sofrem inibição reversível ao OD mesmo em baixas concentrações (0,5% de saturação). Entretanto, foi reportado por Lotti e seu grupo (2014) que a atividade anammox pode ser recuperada mesmo após exposição prolongada a condições aeróbias ($>8 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$). De qualquer forma, altas concentrações de OD podem levar ao crescimento de bactérias oxidadoras de nitrito (BON) que podem competir com bactérias anammox e com bactérias oxidadoras de amônio, podendo causar um colapso no sistema.

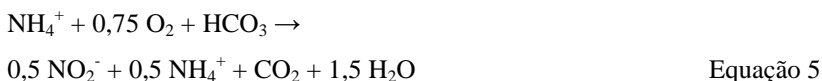
Quanto a temperatura, elas apresentam crescimento entre 20 e 43 °C, sendo a temperatura ótima entre 34 e 36 °C (STROUS *et al.*, 1998). O pH ideal para o crescimento está entre 7 e 8, com o ótimo próximo a 8. Entretanto, esses microrganismos são tolerantes a um amplo espectro de temperatura e podem sobreviver em ambientes com temperaturas de -2 a 85° C (GAO *et al.*, 2011). Além disso, bactérias anammox possuem alta afinidade pelo substrato (nitrito e amônio). Strous *et al.* (1999) determinaram a afinidade a amônia e nitrito para *Ca. Brocadia anammoxidans* como 5 μM . Lotti (2014) calculou a afinidade ao nitrito e encontrou uma velocidade máxima de conversão de $1,25 \text{ gN L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para *Ca. Brocadia*.

Tem-se detectado microrganismos com atividade anammox nas mais diversas fontes, como em lodos provenientes de sistemas de

tratamento de águas residuárias (DAPENA- MORA *et al.*, 2004), efluentes de abatedouro (REGINATTO *et al.*, 2005), ambientes de água doce (SCHUBERT *et al.*, 2006), sedimentos marinhos (TAL *et al.*, 2005) e também em lagoa experimental de tratamento de dejetos suíno (SCHIERHOLT NETO *et al.*, 2007).

3.3.3 PROCESSO DE NITRITAÇÃO PARCIAL (NP)

A nitrificação parcial apresenta-se como um pré-tratamento de efluentes pela atividade das bactérias oxidadoras de amônia (BOA). Esse processo consiste na oxidação parcial (50%) da amônia em nitrito, controlando a proporção de amônia oxidada e impedindo a oxidação a nitrato, para que a reação anammox possa ocorrer de acordo com a sua estequiometria, conforme descrito na equação 5 (IBRAHIM *et al.*, 2015).



Havendo a oxidação parcial de amônia a nitrito, o efluente proveniente desse pré-tratamento, contendo amônia e nitrito, está apto para um tratamento em um reator com atividade anammox, afim de completar o ciclo de remoção de nitrogênio (ZHANG *et al.*, 2011).

3.3.4 PROCESSO DE DESAMONIFICAÇÃO

O processo de desamonificação trata-se da combinação do processo de NP e do processo anammox, onde as bactérias responsáveis por cada etapa encontram-se em simbiose, perfazendo um consórcio efetivo para remoção de nitrogênio. Esse processo pode ocorrer em um ou dois reatores diferentes (Figura 4). Nesse modelo de dois estágios, o primeiro

reator opera em condições de aerobiose, para favorecer a atividade das BOA, gerando uma parcela de nitrito. O efluente da saída do primeiro reator, alimenta o reator anammox, e como resultado, tem-se a remoção da amônia e do nitrito residual.

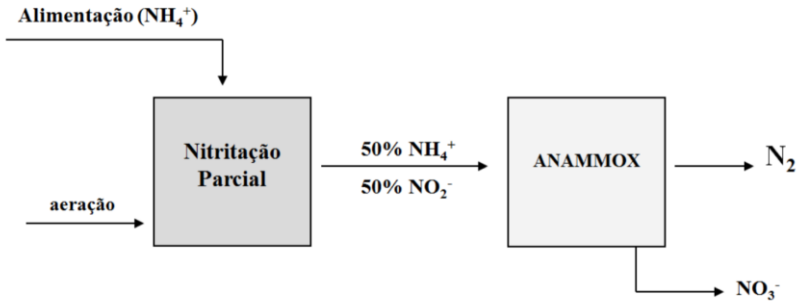
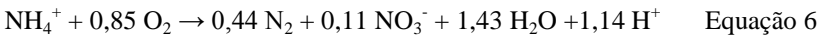


Figura 4 – Esquema do processo de NP + ANAMMOX.

Fonte: (VAN DONGEN *et al.*, 2001, adaptado).

Ainda, esse processo pode ocorrer em um único reator (Figura 5) e a combinação dos dois processos em um único reator resulta na remoção de nitrogênio global, descrita na Equação 6 (DE PRÁ *et al.*, 2016).



O processo de desamonificação em um único reator apresenta menores custos, tendo em vista que não há a necessidade de um reator adicional para nitrificação. Existem mais de 114 unidades de desamonificação ao redor do mundo operando em escala real e aproximadamente 88% desses são operados em etapa única de desamonificação (LACKNER *et al.*, 2014).

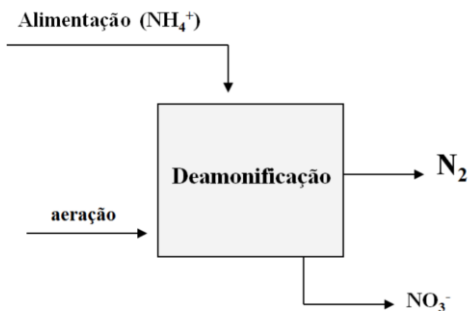


Figura 5 – Esquema do processo de desamonificação.

Fonte: (DE PRÁ, 2012, adaptado).

Entretanto, para que esse processo ocorra deve-se manter condições limitadas de oxigênio dissolvido (JETTEN *et al.*, 2003). Tendo em vista que as bactérias anammox são reversivelmente inibidas por oxigênio, a oxidação do amônio precisa remover o oxigênio do líquido (SLIEKERS *et al.*, 2002). Para que isso ocorra, o fluxo de entrada de oxigênio no reator deve ser mantido inferior ao fluxo de entrada de amônio (JETTEN *et al.*, 2003).

O processo de desamonificação pode ocorrer em reatores do tipo SBR, *airlift* (JETTEN *et al.*, 2003) e sistemas com biofilme (EGLI *et al.*, 2003). Em todos esses casos, observa-se uma formação onde as BOA dispõem-se acima das bactérias anammox (Figura 6). Assim, forma-se um gradiente de concentração de substrato e OD, onde a parte externa mantém-se em condições aeróbias para realização da NP, enquanto que a parte interna permanece em condição de anaeróbiose para atividade anammox. Essa formação é observada em sistemas com biofilme e também em reatores que operam com biomassa em suspensão.

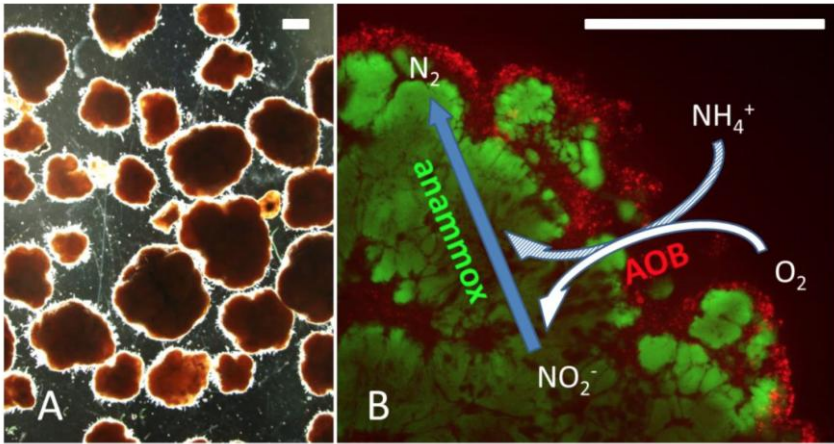


Figura 6 – A: lodo granular proveniente de um processo de desamonificação de único estágio; B: micrografia FISH (do inglês *fluorescence in situ hybridization*) de um grânulo anammox, com setas indicando a disponibilização de nitrito das BOA para as anammox e conversão do nitrito e amônia a nitrogênio gasoso. Bactérias oxidadoras de amônio em vermelho e anammox em verde.

Fonte: (LOTTI, 2014).

A formação descrita na Figura 6, ocorre como forma de proteção e simbiose entre o consórcio microbiano. As bactérias oxidadoras de amônio ficam externas às células anammox, de forma que conseguem captar o oxigênio necessário para seu metabolismo, enquanto as bactérias anammox acabam se estabelecendo em um ambiente anóxico e não tem a sua atividade inibida por OD (LOTTI *et al.*, 2014). Quando o oxigênio se torna limitante para a respiração aeróbia e há presença de NO_3^- no meio, diz-se que o ambiente se tornou anóxico.

3.4 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA

A maioria dos microrganismos encontrados em amostras ambientais como solos e águas residuárias não conseguem ser cultivados em laboratório, tendo em vista que suas rotas metabólicas e condições específicas de crescimento ainda não estão elucidadas (XU, 2006). Dessa forma, para identificação da comunidade microbiana principalmente de amostras ambientais, recorre-se a técnicas independentes de cultivo, como são as técnicas moleculares.

Essas técnicas, que começaram a ser mais utilizadas nos últimos anos devido principalmente à redução de custos, têm revelado uma diversidade microbiana até então não detectável, permitindo a identificação de espécies não cultiváveis. Dá-se o nome de metagenômica a análise genômica de comunidades microbianas de um determinado ambiente por técnicas independentes de cultivo, oferecendo uma visão da estrutura e da função dos organismos presentes (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Dentro da metagenômica, a análise nas variações da sequência nucleotídica do gene codificador da subunidade 16S do rRNA é amplamente utilizada (MADIGAN *et al.*, 2010) e se apresenta como uma ferramenta importante para determinar a relação evolucionária dos microrganismos (BLAUT *et al.*, 2002).

Ribossomos procaríotos possuem duas subunidades, a subunidade maior (50S) e a subunidade menor (30S). O gene do rRNA 16S é um dos componentes da subunidade menor, enquanto que os genes rRNA 23S e 5S compõem a subunidade maior. O rRNA 16S possui um tamanho de 1650 pb,

o que o torna mais informativo que o rRNA 5S (120 pb) e mais prático para análises do que o rRNA 23S (300 pb) (WOESE, 1987).

Como ilustrado na Figura 7, o gene que codifica o rRNA 16S possui regiões altamente conservadas dentro do domínio Bacteria e regiões de variabilidade/hipervariabilidade que são específicas para gêneros e espécies. Regiões hipervariáveis do gene 16S como a região V3-V4 e V5-V6 são vistas como bons iniciadores para sequenciamentos de comunidades microbianas. Além disso, inúmeras sequências do gene de rRNA 16S estão disponíveis em diferentes bancos de dados, o que torna possível o alinhamento e identificação das espécies através de análises bioinformáticas dos dados gerados pelos sequenciamentos.

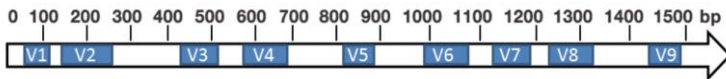


Figura 7 – Esquema do gene rRNA 16S desenhado com base na sequência de *E. coli*. Marcações em azul – regiões variáveis entre gêneros ou espécies. Espaços em branco – sequência conservada no domínio Bacteria.

Fonte: (BROSIUS *et al.*, 1981).

As técnicas moleculares foram impulsionadas com o desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os métodos moleculares que utilizam a técnica de PCR vêm sendo cada vez mais utilizadas na identificação da comunidade microbiana. Nesse contexto, os sequenciamentos de nova geração (NGS) introduzidos em 2005, otimizaram significativamente estudos de diversidade microbiana com custos progressivamente menores (METZKER, 2010).

Diversas plataformas de sequenciamento podem ser utilizadas, entre elas a Roche 454/FLX, Applied Biosystems SOLiD, Ion Torrent e Illumina MiSeq/HiSeq. As plataformas assemelham-se pela capacidade de gerar milhões de sequências de uma única amostra, revelando uma diversidade microbiana muito maior do que a técnica clássica de sequenciamento de Sanger (MARDIS, 2008) e de forma geral, são divididas nas etapas de preparo de bibliotecas e detecção dos nucleotídeos incorporados (SHOKRALLA *et al.*, 2012). Entretanto, cada técnica difere em relação ao tamanho e número de *reads* (sequências nucleotídicas) gerados, a taxa de erro, custo e química utilizada na reação.

Atualmente, as plataformas mais utilizadas são Illumina MiSeq (Solexa, EUA), ou Ion Torrent PGM (Thermo Fisher, EUA), pois são plataformas com custos e capacidade de geração de dados mais adequadas às práticas laboratoriais (CARVALHO, 2016).

A plataforma Illumina realiza um sequenciamento por síntese do DNA, onde os quatro nucleotídeos são incorporados simultaneamente durante o sequenciamento que utiliza a DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos (MARDIS, 2008). Essa plataforma permite, no máximo, a geração de 15 Gb de dados, por meio da utilização do *kit* v3, operando com 600 ciclos (600 pb por leitura). Com *kits* denominados “v2”, sua capacidade máxima cai para 7,5 Gb, com 500 ciclos (500 pb por leitura). O menor *kit* disponível, denominado *nano*, com 150 ciclos, define a menor capacidade da plataforma, que é de 150 Mb.

A plataforma de sequenciamento Ion Torrent™ é uma tecnologia que utiliza um íon condutor, diferindo das outras plataformas que utilizam fluorescência, como a Illumina. Quando um nucleotídeo é incorporado à

cadeia de DNA, há a liberação de hidrogênio e detecção de alteração de pH pelo íon semiconductor (WHITELEY *et al.*, 2012). Tem capacidade máxima de geração de dados de 2,2Gb, sendo, portanto, inferior ao oferecido pelo MiSeq.

A taxa de erro também difere entre os sequenciadores. Na plataforma Ion Torrent, têm-se erro de 1 a cada 100 bases sequenciadas (escore *phred* q20) enquanto que na plataforma MiSeq, o erro é de 1 a cada 1000 bases (*phred* q30). O Ion PGM é mais eficiente na leitura de regiões repetitivas GC, enquanto o MiSeq é mais eficiente com sequências AT. No que diz respeito a taxas de leituras livres de erros, o MiSeq possui maior taxa (5 vezes mais). Em regiões homopoliméricas, o MiSeq gera erros em sequências acima de 20 pb, enquanto que no Ion PGM, esses erros são gerados em sequências repetitivas acima de 8 pb, e não consegue resolver regiões de homopolímeros acima de 14pb. Quanto a custos por par de base (pb), o Ion PGM é aproximadamente duas vezes mais oneroso (CARVALHO, 2016).

Ainda, em ambas as plataformas, pode-se realizar uma corrida *single-end* ou *paired-end*. A corrida *single-end* (de leitura única) envolve o sequenciamento de DNA em uma única extremidade, sendo mais simples e menos custoso. Entretanto, uma corrida *paired-end* (de fim paralelo) permite o sequenciamento das duas extremidades de um fragmento, gerando sequências de alta qualidade com sobreposição. Essa sobreposição, também chamada de *overlap*, facilita a análise bioinformática para correção de erros, se superior a 30 pb.

3.4.1 ANÁLISES BIONFORMÁTICAS DE DADOS

A metagenômica baseada em sequenciamentos de nova geração (NGS) cresceu muito nas últimas décadas e acompanhando esse progresso, a bioinformática cresceu de forma similar, oferecendo uma ampla gama de algoritmos, ferramentas e softwares para abordar todas as tarefas referentes aos NGS, que vão desde o pré-processamento à análise, avaliação e representação gráfica.

Sequenciamentos de nova geração geram dados brutos que precisam passar por controles de qualidade. Para tanto, deve-se analisar o *Phred Score* a ser utilizado e o *pipeline* a ser seguido. Após a etapa de controle de qualidade, deve-se iniciar etapas de correções de erro provenientes do sequenciamento, como remoção de quimeras, de homopolímeros, tamanho mínimo e máximo de *reads*, entre outros. Esses passos tornaram-se fundamentais na metagenômica e foram incorporados como processos padrão em *pipelines* por meio de ferramentas especializadas em bioinformática (YANG *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2014). Os *pipelines* mais utilizados para esses fins são o Mothur e o Qiime.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi conduzido na Embrapa Suínos e Aves, unidade localizada no município de Concórdia – SC.

4.2 SISTEMA EXPERIMENTAL

Durante o estudo, três reatores com diferentes condições operacionais foram acompanhados. Todos os três reatores operavam em escala de bancada. Os Reatores 1 e 2 foram alimentados com meio de cultura sintético contendo NH_4Cl e NaNO_2 como fonte de amônia e nitrito, e adição de micronutrientes, preparados de acordo com o descrito por MAGRÍ *et al.*, 2012. O Reator 3 foi alimentado com dejetos provenientes da suinocultura. A Tabela 3 apresenta as principais características de cada reator e as variáveis operacionais no período da coleta.

Tabela 3 – Principais características dos reatores acompanhados no período da coleta.

	REATOR 1	REATOR 2	REATOR 3
Processo	ANAMMOX	ANAMMOX	NP + ANAMMOX
Condição	Anóxico	Anóxico	Aeração contínua
Alimentação	Meio de cultura sintético	Meio de cultura sintético	Dejeto suíno
TRH (h)	6	1,1	6
Temperatura de operação (°C)	35	35	25
Volume útil (L)	20	1	8

Os reatores 2 e 3 foram inoculados com lodo proveniente do reator 1.

4.3 MONITORAMENTO DOS REATORES

O acompanhamento dos reatores foi realizado por análises físico-químicas de nitrogênio amoniacal (a fim de padronização, lê-se $N-NH_4^+$ como $N-NH_3$), nitrito ($N-NO_2^-$), nitrato ($N-NO_3^-$), todas seguindo metodologia descrita por APHA (2012), na entrada e na saída do reator.

4.3.1 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

Com os dados obtidos a partir das análises das formas nitrogenadas, determinou-se a eficiência de remoção (em %), conforme Equação 7.

$$\eta = \frac{(C_N)_E - (C_N)_S}{(C_N)_E} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

η = Eficiência (%)

$(C_N)_E$ = Concentração de nitrogênio na forma de amônio, nitrito e nitrato na entrada do reator (mgN/L);

$(C_N)_S$ = Concentração de nitrogênio na forma de amônio, nitrito e nitrato na saída do reator (mgN/L).

4.4 COLETA DE AMOSTRAS

Visando contemplar uma amostragem mais representativa, os reatores anammox (1 e 2) foram homogeneizados pela injeção de nitrogênio

gasoso no reator. Retirou-se aproximadamente 50 mL de biomassa de cada reator. Esse processo foi repetido três vezes. Ao final, os 150 mL de biomassa foram também homogeneizados mecanicamente e a biomassa foi depositada em criotubos e armazenada a -20 °C para posterior extração de DNA.

O Reator 3 apresentava agitação pela injeção de O₂, dessa forma, as amostras foram coletadas sem precisar revolver a biomassa. O processo de coleta foi o mesmo do anterior, retiram-se 3 alíquotas de 50 mL de biomassa e ao final, a biomassa foi homogeneizada, depositada em criotubos e armazenadas em freezer a -20 °C para posterior extração de DNA.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA, QUANTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Para extração de DNA utilizou-se 0,25 g de biomassa de cada amostra. O DNA foi extraído com o kit de extração PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc., CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

A biblioteca genômica foi preparada em dois passos de protocolo de PCR (GOHL *et al.*, 2016). Utilizou-se os *primers* (iniciadores) 314F-806R que flanqueiam a região V3-V4 (WANG *et al.*, 2009; CAPORASO *et al.*, 2011). Esses primers permitem uma ótima cobertura taxonômica no domínio Bacteria e Archea (TAKAHASHI *et al.*, 2014).

Os primers da primeira PCR continham as sequências do Illumina com base no adaptador de estrutura *TruSeq* (Illumina, San Diego, CA), permitindo sequências índice na segunda PCR. As reações de PCR foram realizadas em triplicatas utilizando a *Platinum Taq* (Invitrogen, USA)

seguindo as condições: 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e a extensão final de 72 °C por 2 minutos para primeira PCR. Na segunda PCR as condições foram: 95 °C por 5 minutos, 10 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 66 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e a extensão final de 72 °C por 2 minutos. *Beads AMPureXP* (Beckman Coulter, Brea, CA) foram utilizadas para purificar a PCR, e a biblioteca foi diluída para uma qPCR apurada, utilizando-se o *KAPA Library Quantification Kit for Illumina Platforms* (KAPA Biosystems, Woburn, MA). As bibliotecas foram sequenciadas no sistema MiSeq, utilizando os iniciadores padrão do *kit* Illumina. A corrida realizada foi utilizando-se o *kit* V2x500 numa abordagem *paired-end*.

4.6 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

As sequências (ou *reads*) obtidos pelo sequenciamento 16S passaram por um processo de controle de qualidade utilizando-se o *pipeline* SeqyClean. Após essa etapa, os *reads* passaram por etapas de correção de erros como remoção de quimeras, controle de homopolímeros e de tamanho mínimo e máximo das sequências, bem como controle do tamanho de *overlap*, visando remover e/ou atenuar os erros provenientes do sequenciamento.

Posteriormente, realizou-se a *clusterização* das sequências obtidas após o controle de qualidade em *OTUs* (Unidade Taxonômica Operacional). Para tanto, determinou-se a distância genética de 3% para agrupar as sequências, porcentagem sugerida pela literatura para classificar um microrganismo ao nível de espécie (DRANCOURT *et al.*, 2000). Com base nas análises de *OTUs*, foi possível calcular índices de diversidade microbiana e construir curvas de rarefação. O método de rarefação é

utilizado em comparações de comunidades com diferentes tamanhos amostrais, assim, calcula-se o número esperado de espécies em cada amostra para um tamanho de amostra padrão. Esse método permite analisar qual comunidade é mais rica.

As sequências obtidas foram finalmente alinhadas contra um banco de dados para verificação da similaridade das sequências encontradas com sequências previamente depositadas, visando a identificação dos microrganismos presentes nas amostras. No presente estudo, as sequências foram alinhadas contra o banco de dados Silva 128 (QUAST *et al.*, 2013).

Os dados foram todos analisados na plataforma Mothur v.1.39.5 e o *pipeline* utilizado nas análises foi desenvolvido baseado no MiSeq SOP (SCHLOSS *et al.*, 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DOS REATORES

As formas nitrogenadas na entrada e na saída dos reatores foram acompanhadas afim de estabelecer a eficiência de remoção de nitrogênio e, portanto, a eficiência dos processos (NP e ANAMMOX). A Tabela 4 apresenta as concentrações das formas nitrogenadas e a eficiência de remoção de nitrogênio referente a cada reator no dia em que se realizou a coleta de lodo para identificação da comunidade microbiana.

Tabela 4 – Eficiência de remoção de nitrogênio e concentração das formas nitrogenadas na entrada e na saída dos reatores no período da coleta (em mg L⁻¹).

	REATOR 1	REATOR 2	REATOR 3
Entrada NH₃	119,94	96,81	198
Entrada NO₂	94,53	91,07	-
Saída NH₃	21,47	8,43	5
Saída NO₂	9,47	3,58	24
Saída NO₃	15,04	17,51	11
Eficiência de Remoção de N (%)	78,44	92,14	79,89

Todos os reatores apresentavam uma operação estável, com eficiências de remoção de nitrogênio total superiores a 70%. Outro aspecto interessante que pode ser observado (Figura 8) refere-se ao aspecto visual do lodo nos diferentes reatores. Esses, diferem principalmente no que se relaciona à coloração e tamanho de grânulos formados, indicando que as

diferentes condições operacionais de cada reator afetam a estrutura da comunidade microbiana e a granulação.

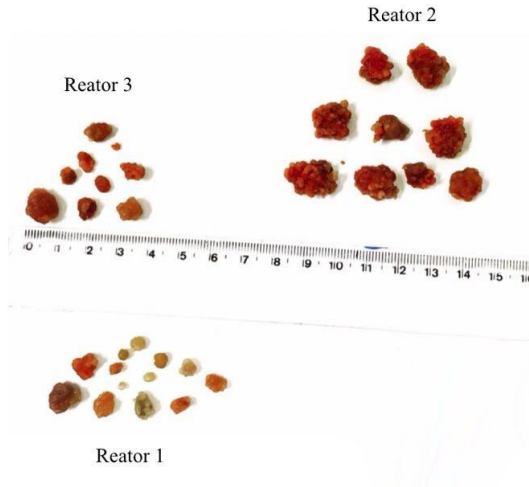


Figura 8 – Aspecto visual das amostras de lodo anammox no momento das coletas de biomassa nos diferentes reatores.

O acompanhamento do reator 2 compreendeu duas fases, sendo a primeira de *start-up* do processo (dia 1-30) e uma segunda fase de operação estável (30-70). A Figura 9 apresenta o acompanhamento temporal da biomassa do reator.

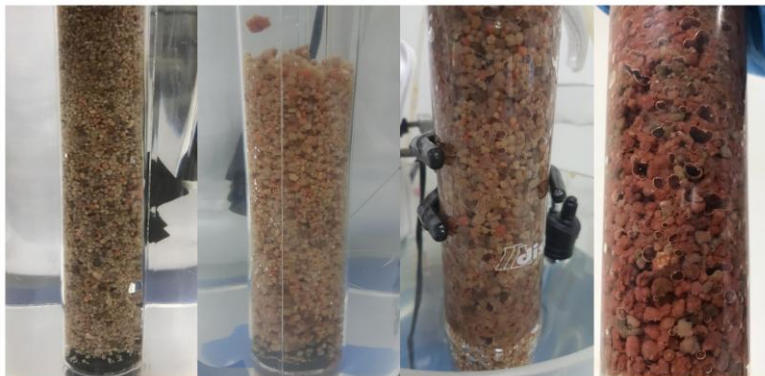


Figura 9 – Acompanhamento temporal do Reator 2.

A mudança de TRH de 5,5h (reator 1) para 1,1h (reator 2) promoveu um aumento da vazão e conseqüentemente uma maior quantidade de meio de cultura circulou pelo reator em menor tempo. Durante os primeiros 7 dias, a eficiência de remoção de nitrogênio calculada foi inferior a 60%. Dentre os dias 7 a 30, a eficiência manteve-se entre 60-70%. A partir do dia 30, observou-se uma eficiência de remoção de nitrogênio total superior a 90%, indicando estabilidade do processo.

O aumento da eficiência do processo indica um aumento da atividade microbiana. Com aumento da atividade microbiológica, eleva-se a taxa metabólica das bactérias anammox e, portanto, há um aumento na concentração de citocromo C no interior do anammoxossomo, levando a biomassa a apresentar uma coloração mais avermelhada.

5.2 SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Após o sequenciamento genético, obteve-se 160735 seqüências provenientes da amostra do Reator 1, 173088 seqüências do Reator 2 e 261452 seqüências do Reator 3. Essas seqüências passaram por um controle

de qualidade utilizando-se *phred score* Q24, reduzindo o número de sequências. Após essa etapa, as sequências ainda passaram por etapas de remoção de erros, e o número de sequências finais analisadas podem ser vistas na Tabela 5. Utilizou-se parâmetros de controles de qualidade como tamanho mínimo das sequências (400 pb), tamanho mínimo de *overlap* (15 pb), número máximo de homopolímeros (7 pb), entre outros como remoção de quimeras e sequências iguais idênticas às quimeras e remoção de ruídos, agrupando sequências que tem ruídos com as mais similares a elas.

Tabela 5 – Número de sequências totais do sequenciamento e número de sequências obtidas após controle de qualidade e remoção de erros.

	REATOR 1	REATOR 2	REATOR 3
Sequências	160735	173088	261452
Totais			
Controle de	140935	155673	235433
Qualidade			
Remoção de	108464	118044	175666
Erros			

Todas as sequências tinham tamanhos maiores que 400 bases, com tamanho medio de 429 bases. As sequências obtidas ao final das etapas de remoção de erros foram normalizadas em 108464 *reads* e clusterizadas em OTUs com similaridade de 97%, ou seja, todas as sequências que fossem apresentassem similaridade maior ou igual a 97%, eram agrupadas em uma única OTU. Foram calculados índices de diversidade para cada amostra, estimando não somente a riqueza da comunidade como o esforço amostral. A Tabela 6 apresenta o número de OTUs observadas e os índices de diversidade Chao e ACE.

Tabela 6 – Número de sequências e OTUs observadas e índices de diversidade calculados.

	REATOR 1	REATOR 2	REATOR 3
Sequências	108646	108646	108646
OTUs observadas	310	290	323
Chao	312	294	330
ACE	311	292	327

Podemos observar que a comunidade microbiana mais rica dentre as amostras é a do Reator 3, seguida pela comunidade do Reator 1 e com menor riqueza a comunidade do Reator 2. Analisando os índices de diversidade calculados e o número de OTUs observadas pode-se perceber que o esforço amostral foi satisfatório sendo que o número de OTUs observadas é muito próximo aos estimadores calculados.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA

Os resultados mostram a preponderância de dois gêneros anammox, *Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia* no lodo dos reatores analisados. Verificou-se também a presença de outros microrganismos, tais como *Anaerolinaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Blastocatellaceae*, *Comamonadaceae*, *Denitratisoma*, *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, organismos frequentemente encontrados em reatores que apresentam atividade anammox. A Figura 10 apresenta a composição majoritária de microrganismos referente a cada reator.

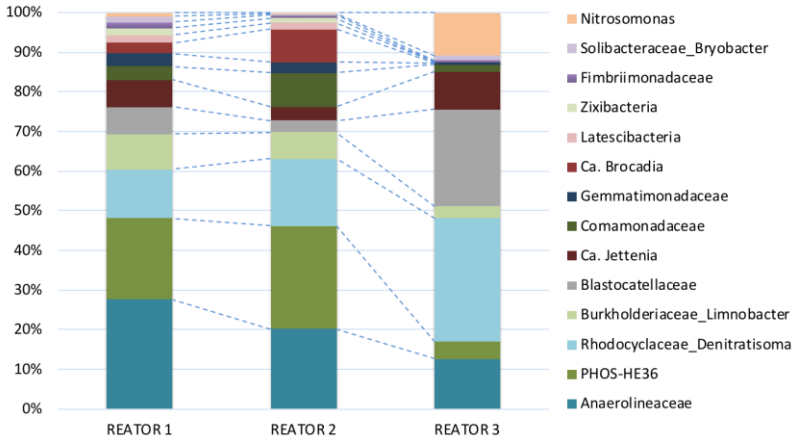


Figura 10 – Abundância relativa de microrganismos dos reatores com base nos dados obtidos.

O Reator 1 possui os dois gêneros anammox quando amostrado, sendo eles *Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia*, com o grupo *Ca. Jettenia* em maior abundância relativa. No Reator 2, também foram identificados os dois gêneros anammox, sendo o gênero *Ca. Brocadia* o mais abundante no reator no momento da coleta. Já no Reator 3, identificou-se apenas a presença do gênero *Ca. Jettenia*.

Na Figura 11, está apresentado o gráfico com as curvas de rarefação a 3% referentes a cada reator com base nos índices de diversidade obtidos. Um gráfico com curvas de rarefação permite identificar qual amostra apresenta a maior riqueza entre as demais, além de estimar o esforço amostral. Quanto maior o número de *OTUs* observadas, mais rica é a comunidade. Nesse contexto, o Reator 3 foi o que apresentou a maior riqueza, ou seja, maior número de *OTUs* dentre os demais reatores, seguido pelo Reator 1. O Reator 2 foi o que o menor número de *OTUs* observadas, ou seja, foi o reator que apresentou menor riqueza amostral. Pode-se

observar que as curvas atingiram um platô e indicam que o esforço amostral foi satisfatório, contemplando quase a totalidade de OTUs possíveis.

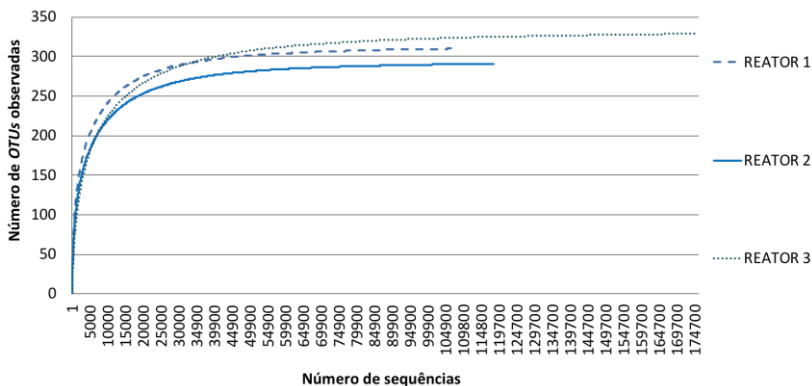


Figura 11 – Curvas de rarefação a 3% de distância genética referentes a cada reator nos dados obtidos.

5.3.1 REATOR 1

O Reator 1 é um reator exclusivamente anammox para manutenção de biomassa e foi alimentado com meio de cultura sintético. No momento da coleta, operava com 78,44% de eficiência de remoção de nitrogênio. Nele, foram identificados dois gêneros anammox com abundâncias distintas. Destes, *Ca. Jettenia* foi mais abundante (7%), enquanto *Ca. Brocadia* apresentou abundância relativa menor (3%). Observando a comunidade microbiana total no reator, *Chloroflexi* foi o filo encontrado em maior abundância (27%), seguido por *Proteobacteria* (24%) e *Chlorobi* (20%). Também foi identificado o filo *Acidobacteria* (9%), como mostra a Figura 12.

O filo *Chloroflexi* está representado pela classe *Anaerolineaceae*, enquanto o filo *Proteobacteria* está representado por três classes diferentes, *Rhodocyclaceae*, *Burkholderiaceae* e *Comamonadaceae*.

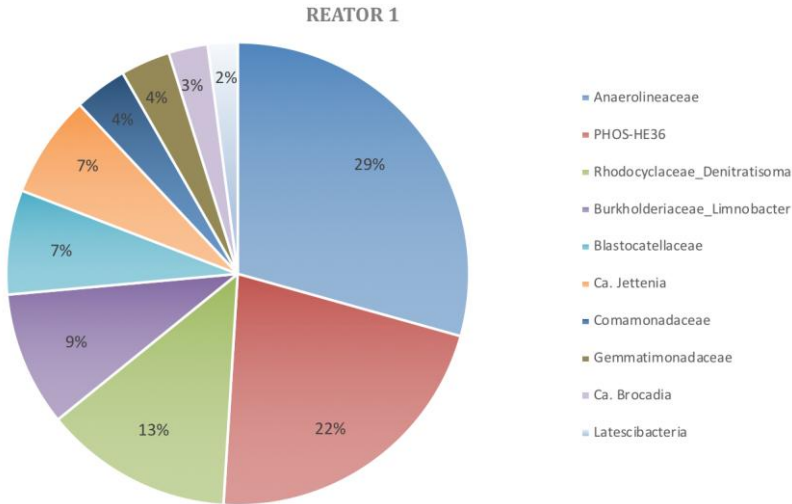


Figura 12 – Abundância de microrganismos no Reator 1 com base nos resultados obtidos.

A classe *Anaerolineaceae* é pertencente ao filo *Chloroflexi*, cuja existência é sempre citada em trabalhos que estudam a comunidade microbiana em reatores anammox. A ecofisiologia desse grupo ainda é pouco conhecida, entretanto, alguns estudos apontam que o filo *Chloroflexi* pode ajudar na degradação de produtos microbianos derivados do decaimento da biomassa em reatores de membrana (MBR) e em biofilmes nitrificantes autotróficos (OKABE *et al.*, 2005; MIURA *et al.*, 2007). As classes do filo *Chloroflexi* já descritas em estudos da comunidade microbiana de reatores anammox pertencem à família *Anaerolineaceae*, encontrada neste estudo, e *Caldilineae*, não encontrada no presente estudo

(PEREIRA *et al.*, 2014; DOSTA *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016).

Existem algumas hipóteses de que quando em reatores anammox, esses microrganismos utilizam compostos orgânicos derivados da lise celular de outras bactérias na sua rota metabólica (KINDAICHI *et al.*, 2012). Estudos recentes indicam que esses indivíduos podem contribuir com a granulação do lodo anammox, moldando a estrutura inicial dos grânulos e permitindo que outros microrganismos possam se unir e crescer (DOSTA *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2016). Além disso, eles têm sido relatados em grande abundância em reatores anammox. Cho *et al.* (2010) encontrou 34,5% de abundância relativa de *reads* na biblioteca genômica referente a um estudo de comunidade microbiana em reator anammox. Costa *et al.* (2014) encontraram 17% em um sequenciamento efetuado com a plataforma 454 Roche e Li *et al.* (2009) encontraram 21,3% de *Chloroflexi* em reator operando sob condições similares a do presente estudo. Por sua vez, Cao *et al.* (2016) encontraram uma abundância de 29,1% desses organismos em um sequenciamento Illumina MiSeq. Nesse estudo, a abundância desses microrganismos foi de 27% no Reator 1.

As bactérias encontradas identificadas como PHOS HE36, são pertencentes ao filo *Chlorobi*, filo que também tem sido frequentemente detectado e citado em estudos de lodo anammox. Esse filo engloba bactérias verdes sulfurosas, que são anaeróbicas e fototróficas, capazes de oxidar sulfeto, perfazendo uma remoção de fósforo com redução de CO₂. Entretanto, o papel desses microrganismos em reatores anammox ainda não está claro (PEREIRA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2014; REN *et al.*, 2015). Tendo em vista que eles removem o sulfeto do meio, podem ser benéficos para bactérias anammox, que são sensíveis a toxicidade desse composto,

ainda que em baixas concentrações de 1-2 mM (DAPENA-MORA *et al.*, 2007). O filo *Chlorobi* foi detectado em lodo anammox em diferentes estudos. Costa *et al.* (2014), reportaram uma abundância de 5,2% em reator anammox. Li *et al.* (2009) relatam em seu estudo uma abundância de 38% de indivíduos pertencentes ao filo *Chlorobi*, e 9,5% em um estudo conduzido por Cao e colaboradores (2016) empregando a plataforma de sequenciamento MiSeq Illumina. No presente estudo, a abundância desses organismos para o Reator 1 foi de 20%.

As classes *Rhodocyclaceae* e *Comamonadaceae* pertencem ao filo *Proteobacteria*. É o maior e mais diverso filo do domínio Bacteria (MADIGAN *et al.*, 2010) e é sempre detectado e citado em estudos da comunidade microbiana de reatores anammox. As classes encontradas nesse estudo são desnitrificantes heterotróficas, ou seja, convertem nitrato a nitrogênio gasoso, consumindo matéria orgânica e convertendo CO₂ em H₂O (COSTA *et al.*, 2014; GONZALEZ-GIL *et al.*, 2015). A presença desse tipo de organismo pode afetar o processo anammox, pois estes podem competir por NO₂⁻. Além disso, bactérias heterotróficas apresentam uma velocidade de crescimento maior do que bactérias autotróficas, podendo dessa forma competir com as bactérias anammox, levando até a inibição o processo (MOLINUEVO *et al.*, 2009).

Entretanto, bactérias heterotróficas desnitrificantes são aeróbias facultativas, ou seja, podem utilizar o nitrato produzido durante a reação anammox como aceptor final de elétrons em ambiente anóxico. Jenni *et al.* (2014), observaram que o aumento da relação C/N em um reator anammox SBR afetou positivamente a remoção de nitrogênio total. Isso se deve ao fato de que o aumento de carga de matéria orgânica permitiu uma maior eficiência na desnitrificação do nitrato produzido pelas bactérias anammox.

Sendo assim, a combinação do consórcio anammox mais bactérias heterotróficas desnitrificantes pode ser benéfico para o tratamento de efluentes, uma vez que melhora a remoção de nitrogênio e promove também a remoção de matéria orgânica.

Cho *et al.* (2010) publicaram um estudo indicando a presença de 22,9% de *reads* do filo *Proteobacteria* em reator anammox. Costa *et al.* (2014) encontraram um valor parecido (21%), sendo similar ao obtido por Pereira *et al.* (2014) (24,6%) e Cao *et al.* (2016) (21,5%), enquanto operando o sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq. Nesse estudo, encontramos uma abundância de 24% desses organismos no Reator 1.

A classe *Blastocatellaceae* encontrada neste estudo, é pertencente ao filo *Acidobacteria*. Estes microrganismos podem utilizar vários compostos para crescimento, desde compostos proteonáceos complexos como xilana, hemicelulose, quitina e amidopectina, como também açúcares, aminoácidos, álcoois e metabolitos intermediários (WARD *et al.*, 2009). Este filo também é frequentemente citado como presente em reatores anammox. Porém, sua relação com as bactérias anammox ainda não foi bem estudada. Cho *et al.* (2010) encontraram uma abundância de 2,1%, enquanto Costa *et al.* (2014) detectaram 8,8%, e Cao *et al.* (2016) encontrou 4,5% em seu estudo. No presente estudo, foi detectado uma abundância de 9% desses organismos associados ao Reator 1.

5.3.1 REATOR 2

O Reator 2 é um reator exclusivamente anammox para enriquecimento da biomassa e foi alimentado com meio de cultura sintético. No momento da coleta, operava com uma eficiência de remoção de nitrogênio de 92,14%. Os dados obtidos mostram mudanças na abundância

relativa dos microrganismos encontrados após o enriquecimento da biomassa anammox. O gênero *Ca. Brocadia* apresentou um aumento relativo de 24,4% (3% no Reator 1 para 8% no Reator 2). Já o gênero *Ca. Jettenia* passou de 7% (Reator 1) para 3% (Reator 2), indicando um decréscimo de 34,1% na abundância relativa.

Como demonstrado na Figura 13, o filo mais abundante no reator foi *Proteobacteria* (31%), seguido por *Chlorobi* (25%) e *Chloroflexi* (20%). Também foi identificado o filo *Acidobacteria* (3%). Em comparação com o Reator 1, observa-se que os filios *Proteobacteria* e *Chlorobi* se sobressaíram, aumentando sua abundância no reator (24-31% e 20-25% respectivamente), enquanto que os filios *Chloroflexi* e *Acidobacteria* apresentaram um decréscimo de 27-20% e 9-3%, respectivamente.

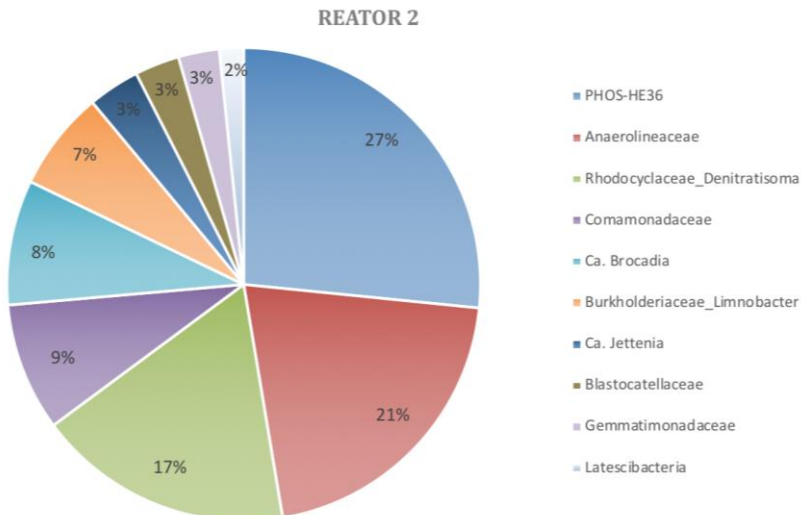


Figura 13 – Abundância de microrganismos no Reator 2 com base nos resultados obtidos.

Com a redução do tempo de retenção hidráulica, a carga de nitrogênio aplicada aumentou e a biomassa teve que se adaptar a essa nova condição operacional. Como apresentado anteriormente, Zhang *et al.* (2017) estudaram as taxas de crescimento máximas para os gêneros *Ca. Brocadia* e *Ca. Jettenia*. Verificou-se que o gênero *Ca. Brocadia* possui um tempo de duplicação de 2,1 dias, enquanto que o gênero *Ca. Jettenia* possui um tempo de duplicação de 3,9 dias. Esses dados podem explicar o motivo de ter-se encontrado uma maior população de *Ca. Brocadia* no Reator 2. A alteração do tempo de retenção hidráulica e a maior disposição de meio de cultura e substrato para via metabólica dos grupos anammox, favoreceu a atividade desses microrganismos. Tendo em vista que o gênero *Ca. Brocadia* possui um tempo de geração mais curto, este teve um maior crescimento, aumentando sua abundância relativa no Reator 2, como demonstrado pelos dados analisados.

5.3.1 REATOR 3

O Reator 3 é um reator de desamonificação, que combina o processo de nitrificação parcial com o processo anammox. Operou com dejetos suíno e no momento da coleta operava com uma eficiência de remoção de nitrogênio de 79,89%. Neste, apenas o gênero anammox *Ca. Jettenia* foi identificado (9%).

Quando em diferentes condições operacionais, o gênero *Ca. Jettenia* apresentou um acréscimo na abundância relativa (7% no Reator 1 para 10%), enquanto o gênero *Ca. Brocadia* reduziu de 3% (Reator 1) passando a não ser mais detectado. Esses dados indicam uma provável competição entre os gêneros anammox, com *Ca. Jettenia* mostrando maior aptidão no ambiente encontrado no Reator 3 no momento da coleta.

O filo *Proteobacteria* foi o mais abundante entre os filios encontrados, representando 47% da abundância total no reator (Figura 14). O segundo filo em maior abundância foi *Acidobacteria* (24%), seguido por *Chloroflexi* (12%) e *Chlorobi* (4%). Em comparação com o Reator 1, os filios *Proteobacteria* e *Acidobacteria* aumentaram sua abundância, subindo de 24 para 47% e 9 para 24% respectivamente. Já os filios *Chloroflexi* e *Chlorobi* diminuíram sua abundância, apresentando uma queda de 27 para 12% e 20 para 4% dentro do reator. O grande aumento do filo *Proteobacteria* deve-se ao inóculo utilizado. Como já apresentado, o Reator 3 foi inoculado com bactérias anammox e com bactérias oxidadoras de amônio, principalmente do gênero *Nitrosomonas*, pertencente ao filo *Proteobacteria*.

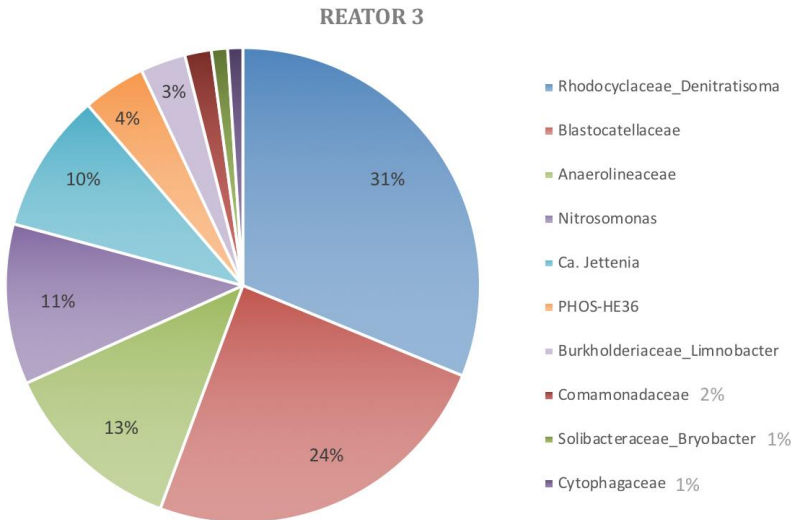


Figura 14 – Abundância de microrganismos no Reator 3 com base nos resultados obtido.

A configuração do Reator 3 é nova na literatura, e está passando por um processo de patenteação. Tendo em vista que não há nenhum reator operante sob as mesmas condições operacionais, não foi encontrado na literatura explicação para o domínio do gênero *Ca. Jettenia*. É provável que as diferentes condições operacionais do reator tenham favorecido esse gênero, bem como é fácil propor que esse gênero tenha sido favorecido, ou tenha sido o único apto a utilizar os substratos provindos do tipo de afluente utilizado.

5.3.3 PRINCIPAIS GRUPOS DE MICRORGANISMOS ENCONTRADOS

A Tabela 7 apresenta a composição dos reatores em termos microbiológicos segundo os dados obtidos pelo sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq.

Tabela 7 – Principais microrganismos encontrados nos diferentes reatores operacionais.

(%)	REATOR 1	REATOR 2	REATOR 3
<i>Ca. Jettenia</i>	7	3	10
<i>Ca. Brocadia</i>	3	8	-
<i>Chloroflexi</i>	27	20	12
<i>Proteobacteria</i>	24	31	47
<i>Chlorobi</i>	20	25	4
<i>Acidobacteria</i>	9	3	24
<i>Bacteroidetes</i>	-	-	-
<i>Nitrospirae</i>	-	-	-

O lodo do Reator 1, serviu de inóculo para partida dos Reatores 2 e 3. Dessa forma, foi possível observar que diferentes condições operacionais

influenciam a dinâmica da comunidade microbiana dentro dos reatores. Além disso, no presente estudo, foram identificados apenas dois gêneros anammox no lodo dos reatores da Embrapa Suínos e Aves.

6 CONCLUSÃO

O sequenciamento de nova geração realizado utilizando-se a plataforma Illumina MiSeq e a construção da biblioteca genômica com primers que flanqueavam a região V3-V4 do gene ribossomal 16S foi capaz de identificar gêneros anammox. Todos os reatores apresentaram eficiências de remoção de nitrogênio total superiores a 70% com apenas um ou dois gêneros anammox atuantes.

Também foi possível observar que diferentes condições experimentais influenciam na dinâmica da comunidade microbiana, entretanto, a relação entre as condições experimentais e o comportamento da comunidade microbiana deve ser melhor analisada.

7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Estabelecer relações entre o comportamento da comunidade microbiana frente mudanças nas condições experimentais de reator.

Estudar as velocidades de crescimento específicas para cada gênero anammox.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, A. S. **Remoção de nitrogênio de efluentes industriais e novas alternativas de tratamento.** Trabalho de diplomação em Engenharia Química, UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

AHN, Y. H. **Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review.** Process Biochemistry. 2006.

Associação Brasileira de Proteína Animal - ABPA. **Relatório Anual 2017.** Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em: fev 2018.

BERNHARD, A. **The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact.** Nature Education Knowledge. 2010.

BITTON, G. **Wastewater microbiology.** 3. ed. New Jersey, Ed. John Wiley & Sons. 2005.

BROSIUS, J; DULL T.J.; SLEETER, D.D.; NOLLER, H.F. **Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from E. coli.** Journal of Molecular Biology. 1981.

BURKHOLDER, J. et al. **Impacts of waste from concentrated animal feeding operations on water quality.** Environmental Health Perspectives. 2007.

CAO S, Du R, Li B, et al. **High-throughput profiling of microbial community structures in an ANAMMOX-UASB reactor treating high-strength wastewater.** Applied Microbiologic Biotechnology. 2016.

CASAGRANDE, C. G.; KUNZ, A.; DE PRÁ, M. C.; BRESSAN, C. R.; SOARES, H. M. **High nitrogen removal rate using ANAMMOX process at short hydraulic retention time.** Water Science and Technology. 2013.

CERVANTES, F.J. **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution.** IWA Publishing. 2009.

CHERUBINI, E. et al. **Life cycle assessment of swine production in Brazil : a comparison of four manure management systems.** 2015.

CHINI, A.; KUNZ, A.; VIANCELLI, A.; SCUSSIATO, L.A.; DIAS, J.R.; JACINTO, I.C. **Recirculation and Aeration Effects on Deammonification Activity.** Water, Air and Soil Pollution. 2016.

CHO S, Takahashi Y, Fujii N, et al. **Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic upflow granular bed Anammox reactor.** Chemosphere. 2010.

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução N° 430.** 2011.

COSTA MCMS, Carvalho L, Leal CD, et al. **Impacto de inoculação e condições operacionais na estrutura da comunidade microbiana de dois reatores anammox.** Environmental Technology. 2014.

DAPENA-MORA, A., VAN HULLE, S. W. H., CAMPOS, L. J., MÉNDES, R., VANROLLEGHEM, P.A., JETTEN, M. **Enrichment of**

Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2004.

DAPENA-MORA A, Fernández I, Campos JL, et al. **Evaluation of activity and inhibition effects on anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production.** Enzyme Microbiologic Technology. 2007.

DE LA TORRE, A.I.; CARBALHO, J.M.; ROSET, F.J.; MUÑOS, M.J. **Ecotoxicological evaluation of pig slurry.** Chemosphere. 2000.

DE PRÁ, M. C.; KUNZ, A.; BORTOLI, MARCELO; SCUSSIATO, L. A.; SOARES, H. M. **Eficiência Da Remoção De Nitrogênio Do Processo De Desamonificação Utilizando Bactérias com Atividade anammox.** In: 28 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES: Rio de Janeiro. 2015.

DE PRÁ, M.C.; KUNZ, A.; BORTOLI, M.; SCUSSIATO, L.A.; COLDEBELLA, A.; VANOTTI, M.; SOARES, H.M. **Kinetic models for nitrogen inhibition in ANAMMOX and nitrification process on deammonification system at room temperature.** Bioresource Technology. 2016.

EGLI, K. et al. **Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon.** Microbial Ecology.2003.

EPA. **Nitrogen control.** Washington, DC. 1993.

FAO. **Livestock's long shadow - environmental issues and options**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006.

FATMA. **Instrução Normativa 11 - Suinocultura**. Fundação do Meio Ambiente -FATMA. 2014.

GASQUES, J. G. et al. **Desempenho E Crescimento Do Agronegócio No Brasil**. 2004.

GERARDI, M. H. **Wastewater Bacteria**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 2006.

GONZALEZ-MARTINEZ, A. et al. **Performance and bacterial community dynamics of a CANON bioreactor acclimated from high to low operational temperatures**. Chemical Engineering Journal. 2016.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, A.; GONZALEZ-LOPEZ, J. **New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal: effect of protein and amino acids degradation**. Amino Acids. 2016.

GONZALEZ-GIL, G., Sougrat R, Behzad AL, et al. **Microbial community composition and ultrastructure of granules from a full-scale anammox reactor**. Microbial Ecology. 2015.

GRADY, C. P. L. Jr., DAIGGER, G. T., LIM, C. H. **Biological Wastewater Treatment**. New York: Ed. Marcel Dekker. 1999.

HRIBAR, C. **Understanding Concentrated Animal Feeding Operations and Their Impact on Communities**. 2010.

INOUE J, Oshima K, Suda W, et al. **Distribution and evolution of nitrogen fixation genes in the phylum bacteroidetes.** *Microbes Environmental.* 2015.

JETTEN M. S. M. **Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('ANAMMOX') process.** *Environmental biotechnology.* 2001.

JETTEN, M. S. M. et al. **Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria.** *Reviews in Environmental Science and Biotechnology.* 2002.

JETTEN, M. S. M. et al. **CANON and ANAMMOX in a gas-lift reactor.** *FEMS Microbiology Letters.* 2003.

JETTEN, M. S. M., VAN NIFTRIK, L., STROUS, M., KARTAL, B., KELTJENS, J. T., OP DEN CAMP, H. J. **Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria.** *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2009.

KUNZ, A.; HIGARASHI, M. M.; OLIVEIRA, P. A. **Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil.** *Cadernos de Ciência e Tecnologia (EMBRAPA).* 2005.

KUNZ, A., BORTOLI, M. HIGARASHI, M. M. **Avaliação do manejo de diferentes substratos para compostagem de dejetos líquidos de suínos.** *Acta Ambiental Catarinense.* 2008.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. R. **Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil.** *Bioresource Technology.* 2009.

KRAPAC, I.G., et al. **Impacts of swine manure pits on groundwater quality**. Environmental Pollution. 2002.

LACKNER, S. et al. **Full-scale partial nitrification/anammox experiences - An application survey**. Water Research. 2014.

LI X, Du B, Fu H, et al. **The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor community**. Systematic and Applied Microbiology. 2009.

LIN, H. et al. **Effects of manure and mineral fertilization strategies on soil antibiotic resistance gene levels and microbial community in a paddy-upland rotation system**. Environmental pollution. 2016.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. **Comparison of Next-Generation Sequencing Systems**. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012.

LOMAN, N. J.; MISRA, R. V.; DALLMAN, T. J.; CONSTANTINIDOU, C.; GHARBIA, S. E.; WAIN, J.; PALLEN, M. **Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms**. Nature Biotechnology, New York. 2012.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., STAHL, D. A., CLARK, D. P. **Brock Biology of Microorganisms**. Pearson Benjamin- Cummings, San Francisco. 2010.

MARDIS, E. R. **Next-Generation DNA sequencing methods**. Annual Review of Genomics and Human Genetics, Baltimore, v. 9, p. 387- 402, 2008.

MCBRIDE MJ, ZHU Y. **Gliding motility and Por secretion system genes Are widespread among members of the phylum bacteroidetes.** Journal of Bacteriology. 2013.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and reuse.** New York, USA: McGraw Hill. 2003.

METZKER, M. L. **Sequencing technologies – the next generation.** Nature Review Genetics.2010.

MOLINUEVO B, García MC, Karakashev D, et al. **Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: effect of organic matter content on process performance.** Bioresource Technology. 2009.

MULDER, A., VAN DE GRAAF, A. A., ROBERTSON, L. A., KUENEN J. G. **Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized reactor.** FEMS Microbiology Ecology. 1995.

OKABE S, Kindaichi T, Ito T. **Fate of 14C-labeled microbial products derived from nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms.** Applied Environmental Microbiology. 2005.

PALHARES, J. C. P. **Pegada hídrica dos suínos abatidos nos estados da região centro-sul do Brasil.** Acta Scientiarum - Animal Sciences. 2011.

PAQUES, ANAMMOX. **Disponível em:**
<<http://www.paques.nl/?pid=46>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

PERDOMO, C. C. **Produção de suínos e meio ambiente.** 9º Seminário Nacional de Desenvolvimento da Suinocultura, p. 8–24, 2001.

PEREIRA, A. et al. **Microbial communities in anammox reactors: a review**, Environmental Technology Reviews. 2017.

PEREIRA A. D. et al. **Effect of phenol on the nitrogen removal performance and microbial community structure and composition of an anammox reactor**. Bioresource Technology. 2014.

PRÁ, M. C. DE; KUNZ, A.; BORTOLI, M.; PERONDI, T.; CHINI, AN-GÉLICA; SOARES, H. M. **Partial nitritation + ANAMMOX process for nitrogen removal from swine wastewater** In: ASABE Annual International Meeting. 2012a.

PRÁ, M.C. DE; KUNZ, A.; BORTOLI, M.; PERONDI, T.; CHINI, A. **Simultaneous removal of TOC and TSS in swine wastewater using the partial nitritation process**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2012b.

QUAST, C. et al. **The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools**. Nucleic Acids Research. 2013.

REGINATTO V., TEIXEIRA, R. M., PEREIRA, F., SCHMIDELL, W., FURIGO, A. J., MENES, R., ETCHEBEHERE, C., SOARES, H. M. **Anaerobic ammonium oxidation in a bioreactor treating slaughterhouse wastewater**. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 2005.

REN L, Liang S, Ngo HH, et al. **Enhancement of anammox performance in a novel non-woven fabric membrane bioreactor (nMBR)**. RSC. 2015.

SCHIERHOLT NETO, G. F. et al. **Análise por injeção em fluxo para determinação de nitrato e nitrito em amostras de águas e dejetos de animais.** In: XI Encontro Nacional sobre Metodologias de Laboratório da Embrapa. Anais. 2006.

SCHIERHOLT NETO, G. F. **Desenvolvimento de uma Flora de Microrganismos Oxidadores Anaeróbios De Amônia Utilizando Inóculos Provenientes De Dejetos De Suíno.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2007.

SCHMID, M., TWACHTMANN, U., KLEIN, M., STROUS, M., JURETSCHKO, S., JETTEN, M. S. M., METZGER, J., SCHLEIFER, K. H., WAGNER M. **Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation.** Systematic and Applied Microbiology. 2000.

SCHMIDELL, W., SPILLER, A. R. **Remoção de Nitrogênio.** V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. 2005.

SCHUBERT, C.J., DURISCH-KAISER, E., WEHRLI, B., THAMDRUP, B., LAM, P., KUYPERS, M. M. M. **Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika).** Environmental Microbiology. 2006.

SCUSSIATO, L. A.; KUNZ, A.; AMARAL, A. C.; CHINI, ANGÉLICA; DE PRÁ, M. C.; JACINTO, I. C. **Nitrogen Removal by Deammonification Process Using EGSB Reactor** In: IV International Symposium on Agricultural and Agroindustrial Waste Management, Rio de Janeiro, 2015.

SEGANFREDO, M. A. **Gestão Ambiental na Suinocultura**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2007.

SLIEKERS, A. O. et al. **Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor**. Water Research. 2002.

STROUS, M. et al. **The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium – oxidizing microorganisms**. Applied Microbiology and Biotechnology. 1998.

STROUS, M., FUERST J., KRAMER, E., LOGEMANN, S., MUYZER, G., PASSCHOONEN, K. T. VAN DE, WEEB, R., KUENEN, J. G., JETTEN M. S. M. **Missing lithotroph identified as new planctomycete**. Nature. 1999.

TAL, Y., WATTS, J. E. M., SCHREIER, H. J. **Anaerobic Ammonia-Oxidizing Bacteria and Related Activity in Baltimore Inner Harbor Sediment**. Applied and environmental microbiology. 2005.

TANG, C. J., ZHENG, P., WANG, C. H., MAHMOOD, Q., ZHANG, J. Q., CHEN, X. G.; ZHANG, L., CHEN, J. W. **Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge**. Elsevier Journal. 2010.

TSUSHIMA, I. et al. **Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (ANAMMOX) biofilm reactors**. Water Research. 2007.

VAN DE GRAAF, A. A. et al. **Autotrophic Growth of Anaerobic Ammonium oxidizing micro-organisms in a Fluidized Bed Reactor**. Microbiology. 1996.

VAN DER STAR, W. R. L. **Growth and Metabolism of Anammox Bacteria**. Technische Universiteit Delft. 2008.

VAN DER STAR WRL, Abma WR, Blommers D, et al. **Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam**. Water Research. 2007.

VAN DONGEN, U.; JETTEN, M.S.M.; van LOOSDRECHT, M.C.M. **The SHARON-ANAMMOX process for treatment of ammonium rich wastewater**. Water Science and Technology. 2001.

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

VIANCELLI, A.; KUNZ, A.; BAUERMAN, F.V.; FURUKAWA, K.; ESTEVES, P.; FUJII, T.; ANTONIO, R. V.; VANOTTI, M. **Bacterial Biodiversity from an Anaerobic up Flow Bioreactor with ANAMMOX Activity Inoculated with Swine Sludge**. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2011.

VIVIAN, M., KUNZ, A., STOLBERG, J., PERDOMO, C., TECHIO, V. H. **Eficiência da interação biodigestor e lagoas de estabilização na remoção de poluentes em dejetos de suínos**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental. 2010.

XU H, et al. **Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I define gemcitabine diphosphate binding and subunit assembly**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. 2006.

WANG E.T., Chen W.F. **Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China.** Soil Biology and Biochemistry. 2008.

WANG B, Peng Y, Guo Y, et al. **Illumina MiSeq sequencing reveals the key microorganisms involved in partial nitrification followed by simultaneous sludge fermentation, denitrification and anammox process.** Bioresource Technology. 2016.

WANTAWIN C, Juathea J, Noophan PL, et al. **Autotrophic nitrogen removal in sequencing batch biofilm reactors at different oxygen supply modes.** Water Science Technology. 2008.

WETT B. **Solved upscaling problems for implementing deammonification of rejection water.** Water Science Technology. 2006.

WHITELEY A.S., Jenkins S., Waite I., Kresoje N., Payne H., Mullan B., Allcock R., O'Donnell A. **Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform.** Journal of Microbiological Methods. 2012.

WOESE C. R. **Bacterial Evolution.** Microbiology Reviews. 1987.

YAN, Z. et al. **Manure and nitrogen application enhances soil phosphorus mobility in calcareous soil in greenhouses.** Journal of environmental management. 2016.

YE R. W.; THOMAS S.; M. **Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications.** Current Opinion in Microbiology. 2001.

ZAURA, E.; KEIJSER, B.; HUSE, S.; CRIELAARD, W. **Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities.** BMC Microbiology. 2009.

ZHANG, B. et al. **Quantification and comparison of ammonia- oxidizing bacterial communities in MBRs treating various types of wastewater.** Bioresource Technology. 2011.

ZHANG J, Zhou J, Han Y, et al. **Start-up and bacterial communities of a single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitrification (SNAP) for treatment of high strength ammonia wastewater.** Bioresource Technology. 2014.

ZHU, G., PENG, Y., LI, B., GUO, J., YANG, Q. WANG, S. **Biological Removal of Nitrogen from Wastewater.** Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 2008.