



## II-349 - ENRIQUECIMENTO E CULTIVO DE BACTÉRIAS ANAMMOX A PARTIR DE AMOSTRA DE LODOS ATIVADOS

**Juliana Calábria de Araújo<sup>(1)</sup>**,

Bióloga pela UFRJ. Doutora em Hidráulica e Saneamento pela EESC/USP. Pesquisadora do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da UFMG e professora do CEFET/MG.

**Ana Paula Campos<sup>(2)</sup>**

Bolsista DTI do CNPq no projeto FINEP: Caracterização e quantificação de microrganismos em sistemas de Tratamento de Efluentes líquidos, desenvolvido no DESA/UFMG. Mestranda do DESA/UFMG

**Marcos Messias de Souza Correa<sup>(2)</sup>**

Biólogo pela PUC-Betim. Bolsista AT-NS do CNPq no projeto FINEP, desenvolvido no DESA/UFMG.

**Eduardo Carvalho Silva<sup>(2)</sup>**

Estudante de biologia da UFMG. Bolsista IC do CNPq no projeto FINEP, desenvolvido no DESA/UFMG.

**Marcos Von Sperling<sup>(2)</sup>**

Engenheiro Civil e Sanitarista. Doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade de Londres – UK. Professor Titular do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

**Carlos Augusto de Lemos Chernicharo<sup>(2)</sup>**

Engenheiro Civil e Sanitarista. Doutor em Engenharia Ambiental pela Universidade de Newcastle upon Tyne – UK. Professor Associado do DESA/UFMG.

**Endereço<sup>(1)</sup>** : Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), Av Amazonas, 5253- Nova Suíça- Belo Horizonte-MG- CEP: 30480-000- Tel: (31) 3319-7109- e-mail: juli.calabria@ig.com.br

**Endereço<sup>(2)</sup>** : Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG; Av. do Contorno, nº. 842 - 7º. andar - Centro - Belo Horizonte - MG - CEP: 30110-060 - Brasil - Tel: (31) 3409-1050 - e-mail: campos1984@hotmail.com

### RESUMO

Bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia (ANAMMOX) foram enriquecidas em reator batelada seqüencial (RBS), a partir de amostra de lodo ativado coletado da Estação de tratamento de esgoto doméstico da cidade de Belo Horizonte. Após 90 dias de cultivo, atividade Anammox começou a ser detectada, pelo consumo de quantidades estequiométricas de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NH}_4^+$  no sistema. Análises de hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) complementares ao RNAr 16S de bactérias anammox, demonstraram que a biomassa desenvolvida no RBS (após 6 meses de cultivo) apresentou sinal positivo com ambas as sondas. A contagem do número de células hibridadas com a sonda Amx1240 (específica para *Candidatus Brocadia anammoxidans*) revelou que 53% das células eram bactérias anammox. Os resultados obtidos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores específicos confirmaram a presença de anammox, tanto no lodo de inóculo quanto no lodo cultivado no RBS. O processo de enriquecimento e cultivo pode ser dividido em três fases: fase inicial (de 20 dias) com atividade desnitrificante intensa, fase de propagação (de 75 dias) e a fase estacionária. O sucesso do cultivo foi obtido em RBS operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas. O desempenho do reator ao longo de quase sete meses de operação demonstrou remoção quase que total de nitrito baseada em uma concentração afluente de 61 a 95 mg/l de  $\text{N-NO}_2^-$ . A eficiência máxima de remoção de amônia alcançada foi de quase 90% a partir de concentração afluente de 55 a 82 mg/l de  $\text{N-NH}_4^+$ . Conclui-se, portanto, que o enriquecimento de bactérias anammox foi possível a partir de amostra de lodo ativado, sob condições controladas, em um período de três meses.

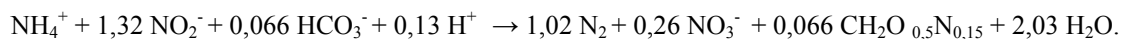
**PALAVRAS-CHAVE:** Anammox; Desnitrificação; FISH; PCR; Remoção de Nitrogênio.

### INTRODUÇÃO

A remoção de nitrogênio é um tema importante no tratamento de águas residuárias e geralmente é realizada por processos microbiológicos como nitrificação e desnitrificação. Essas reações são conhecidas desde muito tempo e vêm sendo aplicadas com sucesso na maioria dos sistemas modernos de tratamento de águas residuárias (EGLI *et al.*, 2001). Há quase uma década, foi verificado, em reator de leito fluidizado, um processo microbiológico novo para a remoção de nitrogênio (MULDER *et al.*, 1995). Este processo foi denominado de anammox (“anaerobic ammonium oxidation”), e envolve a oxidação anaeróbia do íon amônio



a nitrogênio gasoso, sob condições anóxicas estritas usando o nitrito como acceptor final de elétrons (VAN de GRAAF *et al.*, 1996). O modo de crescimento autotrófico (em combinação com a necessidade de alta manutenção associada ao crescimento lento) resulta em uma estequiometria que apresenta um baixo rendimento de biomassa (STROUS *et al.*, 1998), conforme a equação:



O processo ANAMMOX em combinação com o processo SHARON (“Single reactor system for High Ammonia Removal Over Nitrite”) vem se constituindo em uma nova alternativa para remover compostos nitrogenados de efluentes contendo alta concentração de amônia e pequenas quantidades de matéria orgânica biodegradável. A aplicação desses dois processos combinados reduziria em 60% a demanda por oxigênio (comparado com o processo convencional de nitrificação e desnitrificação) e eliminaria a necessidade de adição de metanol (Van Dongen *et al.*, 2001). Não obstante, a aplicação do processo anammox é limitada pela disponibilidade de biomassa anammox.

Os organismos ANAMMOX estão classificados no grupo dos Planctomicetos, cinco dos quais foram denominados provisoriamente de *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, *Candidatus Scalindua wagneri*, *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* (KARTAL *et al.*, 2007) e *Candidatus Jettenia asiatica* (QUAN *et al.*, 2008), que se constituem em um grupo interessante de bactérias com muitas propriedades raras ou únicas. Elas apresentam morfologia de cocos com diâmetro menor que 1 µm (VAN NIFTRIK *et al.*, 2004), tempo de duplicação de aproximadamente 11 dias e são fisiologicamente distintas dos outros membros do grupo, pois são anaeróbias e quimiolitotótrofas. A maioria das bactérias ANAMMOX ainda não foi isolada, portanto, técnicas moleculares como a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são essenciais para o futuro das pesquisas com estas bactérias (SCHMID *et al.*, 2005).

O objetivo deste trabalho foi o de isolar e produzir biomassa anammox (cultivando e aumentando esta população), a partir de lodo aeróbio proveniente de um sistema de lodos ativados, utilizando um reator em batelada sequencial.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### LODO DE INÓCULO E MEIO DE CULTURA

Utilizou-se como inóculo 650 ml de lodo proveniente do sistema de lodos ativados da ETE ARRUDAS-COPASA (Belo Horizonte /MG) que trata esgoto doméstico da cidade de Belo Horizonte. Este lodo foi previamente centrifugado, de modo que o reator foi inoculado com 2,6 g de STV em 1,0 L de meio mineral autotrófico (conforme composição descrita em DAPENA-MORA *et al.* (2004) e VAN de GRAAF *et al.* (1996)). O meio de cultura continha, inicialmente, 30 mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 30 mg/L de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Esse lodo foi escolhido, pois em trabalho prévio (ARAUJO & CHERNICHARO, 2007) verificou-se a presença de bactérias anammox no mesmo através da técnica da reação em cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores específicos para este grupo. Não obstante esse lodo não apresentava atividade anammox, tampouco foram detectadas bactérias anammox através da técnica de FISH.

### OPERAÇÃO DO REATOR EM BATELADA SEQUENCIAL (RBS)

Um fermentador (BioFlo110, New Brunswick) de vidro com volume total de 1,0L foi usado para o enriquecimento e cultivo das bactérias anammox. O fermentador possuía controle automático de temperatura (com manta aquecedora envolvendo o frasco de vidro), pH, agitação, sensor de OD, e sensores de nível para controlar a alimentação. O fermentador foi operado sob a forma de reator em batelada sequencial (RBS), que consistiu de dois ciclos, cada um contendo 3 fases. O primeiro ciclo tinha a duração de 6 horas e 30 minutos e compreendeu: (i) fase de alimentação na qual o meio mineral autotrófico (500 ml) foi introduzido no reator (com agitação contínua) ao longo de 5 horas e 30 minutos; (ii) fase de decantação (30 minutos), na qual a agitação do sistema foi desligada e permitiu-se a decantação da biomassa; e, (iii) fase de retirada do meio (foram retirados 500 ml) que durava 30 minutos. O segundo ciclo durava cerca de 17 horas e 30 minutos, possuía as mesmas etapas do primeiro, com a diferença de que após as 5 horas e 30 minutos de alimentação do reator, o meio de cultura continuava reagindo com a biomassa por cerca de 11 horas. Após esse tempo, foram



realizadas as etapas de decantação e retirada do meio de cultura. O reator foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas e retenção total de biomassa.

Ao longo da operação do reator, as concentrações de amônia e nitrito (afluente e efluente) eram monitoradas, a cada dois dias. A temperatura e o pH foram monitoradas quatro vezes ao dia. O reator operou na temperatura de 34°C, e pH 7,5 (com soluções de NaOH e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acopladas a bombas peristálticas para corrigir o pH sempre que necessário). Para manter a anaerobiose do sistema (que é todo fechado), fluxionava-se a mistura de gás Argônio e CO<sub>2</sub> (95%/5%) 4 vezes ao dia (por 10 minutos) no meio líquido do reator, bem como na atmosfera do frasco de alimentação (afluente), contendo meio de cultura autotrófico. Após 30 dias do início de operação do fermentador, passou-se a adicionar diariamente 1,0 ml de hidrazina e 1,0 ml de hidroxilamina (concentração final de 0,1mM), diretamente no reator. De acordo com THIRD *et al.* (2005), como estes compostos são intermediários da reação anammox, a presença deles no início da incubação pode ajudar a acelerar a reação e diminuir o tempo para enriquecer as anammox.

Amônia e nitrito foram determinados colorimetricamente, de acordo com os métodos do fenato e sulfanílico, respectivamente descritos no Standard Methods (2005). A determinação da concentração de sólidos totais voláteis (STV) no lodo de inóculo também foi realizada de acordo com o Standard Methods (2005).

### HIBRIDAÇÃO *IN SITU* COM SONDAS FLUORESCENTES (FISH)

Para confirmar a presença de bactérias anammox no lodo, bem como quantificar esta população, cerca de 2,0 a 10,0 ml de amostra do lodo ativado (inóculo), bem como do lodo enriquecido no reator (após 181 dias de operação) foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS 130mM NaCl, 7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.2) e posteriormente hibridadas com as sondas Amx820 (detecta bactérias anammox dos gêneros *C. Brocadia anammoxidans* e *Kuenenia stuttgartiensis*) e Amx1240 (detecta *C. Brocadia anammoxidans*), de acordo com o protocolo descrito em EGLI *et al.* (2003), usando 40% de formamida (no tampão de hibridação) e 56mM de NaCl (no tampão de lavagem). As sondas Nso1225 (MOBARRY *et al.* 1996) específica para as oxidadoras de amônia da subclasse  $\beta$ -*Proteobacteria*, Nit3 (WAGNER *et al.* 1996), específica para *Nitrobacter* e Ntspa662 para *Nitrospira* (DAIMS *et al.* 2000) também foram aplicadas no lodo enriquecido com o objetivo de investigar a presença das oxidadoras aeróbias da amônia e das oxidadoras de nitrito no RBS. Após a hibridação as amostras foram coradas com 10  $\mu$ l de uma solução de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) a 10 $\mu$ g/ml, e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-50) equipado com câmera colorida refrigerada (QcolorR5C). A porcentagem de células hibridadas com a sonda Amx1240 foi obtida calculando-se o número de células hibridadas em relação ao número total de células coradas com DAPI.

### EXTRAÇÃO DE DNA e PCR COM INICIADORES PARA AS ANAMMOX

O método de extração de DNA utilizado foi igual ao descrito por EGLI *et al.* (2003), utilizando-se de 2,0 a 4,0 ml de lodo. Após a extração, a quantidade e integridade do DNA obtido foram estimadas em gel de agarose 1,0%. Para a detecção e confirmação da presença das bactérias anammox no lodo de inóculo e ao longo do enriquecimento, foram utilizados os seguintes pares de iniciadores (descritos na Tabela 1): Pla46rc (forward) e reversos (Amx820, ou Amx1240, ou Amx667). As condições de amplificação utilizadas foram as mesmas para todos os pares de primers, exceto para o par An7f -An1388r cuja condição seguiu o protocolo de PENTON *et al.* (2006). A amplificação consistiu de etapa inicial de desnaturação de 4 min à 94°C, 35 ciclos que consistiram em 45 s de desnaturação à 94°C, anelamento por 50 s à 56°C, e extensão por 1 min à 72 °C, e extensão final de 7 min à 72°C. A presença e o tamanho dos produtos de PCR amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, através da aplicação de uma alíquota de 5  $\mu$ l do produto de PCR. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução com brometo de etídio, para permitir a visualização do DNA amplificado.

**Tabela 1: Iniciadores usados na reação de PCR para a detecção de Planctomicetos e bactérias anammox**

Iniciador	Especificidade	Sequencia(5'→3')	Referência
Pla46rc	<i>Planctomycetales</i>	GGATTAGGCATGCAAGTC	Egli <i>et al.</i> (2001)
Amx667r	Organismos Anammox	ACCAGAAGTTCCACTCTC	Van der Star <i>et al.</i> (2007)
Amx820r	Gêneros “ <i>Ca. Brocadia</i> ” e “ <i>Ca. Kuenenia</i> ”	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	Schmid <i>et al.</i> (2000)
Amx1240r	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TTTAGCATCCCTTTGTACCAAC C	Schmid <i>et al.</i> (2000)
An7f	Todos os organismos anammox (Gêneros “ <i>Ca. Brocadia</i> ”, “ <i>Ca. Kuenenia</i> ”, e “ <i>Ca. Scalindua</i> ”).	GGCATGCAAGTCGAACGAGG	Penton <i>et al.</i> (2006)
An1388r		GCTTGACGGGCGGTGTG	Penton <i>et al.</i> (2006)

## RESULTADOS DO ENRIQUECIMENTO EM RBS

A Figura 1 apresenta os resultados das concentrações de amônia e nitrito afluente e efluente ao longo dos 200 dias de operação do reator. De acordo com os resultados obtidos, os perfis de concentração de amônia e de nitrito podem ser divididos em três fases: (i) fase inicial; (ii) fase de propagação; e (iii) fase estacionária. A fase inicial de operação, com duração de 20 a 25 dias, foi marcada pelo consumo intenso de nitrito sem que houvesse consumo de amônia, pelo contrário houve aumento da concentração efluente deste composto (Figura 1). Nesta fase, portanto, a desnitrificação foi o processo favorecido (devido a atmosfera anaeróbia e presença de nitrito), eliminando a matéria orgânica presente no meio oriunda da lise celular das bactérias aeróbias presentes no lodo de inóculo. A morte e lise dessas bactérias resultou na liberação de nitrogênio orgânico e quebra deste em amônia. Na Figura 2 a liberação de amônia no meio está evidenciada pelos valores negativos na eficiência de remoção deste composto (nos 25 dias iniciais). Após a lise das bactérias aeróbias, teve início a morte e lise das bactérias desnitrificantes devido a ausência de substratos orgânicos no meio (uma vez que o meio de cultura era autotrófico- sem fonte de carbono orgânico).

A segunda fase, chamada de fase de propagação, durou cerca de 75 dias (do 20<sup>o</sup> dia até o 95<sup>o</sup> dia de operação). Esta fase foi marcada pela exaustão completa dos substratos orgânicos, resultando na diminuição e eliminação da atividade desnitrificante. As concentrações de nitrito efluente nesta fase foram próximas às concentrações afluente (indicando que este aceptor final de elétrons não estava mais sendo consumido). A partir desse momento, as condições do sistema (anaerobiose, meio autotrófico, pH 7,5, etc), devem ter favorecido o aumento da população anammox. Este aumento culminou no aparecimento da atividade anammox (marcada pelo consumo simultâneo de amônia e de nitrito), que foi detectada a partir do 87<sup>o</sup> dia de operação (Figura 1). De acordo com a literatura (DAPENA-MORA *et al.*, 2004, THIRD *et al.* 2005, e CHAMCHOI & NITISORAVUT, 2007) o início da atividade anammox em reator em batelada sequencial pode acontecer após 70 a 120 dias de operação do reator. Portanto, o sistema começou a responder dentro do que foi observado pela literatura. Durante a fase de propagação, a eficiência de remoção de amônia e de nitrito foi variável de 0 a 40% (Figura 2), indicando pequeno consumo desses compostos.

A última fase do cultivo, chamada de fase estacionária (considerada a partir do 100<sup>o</sup> dia de operação), permitiu atingir a remoção quase que completa de amônia no sistema. Neste período as concentrações de amônia e nitrito efluente variaram de 10 mg/l à quase 0 mg/l (Figura 1). A partir do 125<sup>o</sup> dia de operação, as concentrações de amônia e nitrito foram aumentadas gradativamente, sempre respeitando a relação de 1:1,26 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Nesta mesma fase a eficiência de remoção de amônia e nitrito por parte do lodo foi aumentando atingindo cerca de 90% (Figura 2).

O coeficiente estequiométrico de consumo de nitrito em relação à amônia, calculado a partir dos dados do RBS (Figura 3), a partir 90<sup>o</sup> dia de operação, foi relativamente próximo ao valor descrito na literatura para a reação anammox (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: 1: 1,32, STROUS *et al.*, 1998). Isso demonstra que o lodo ativado após 90 dias de cultivo em meio autotrófico e anaeróbio desenvolveu atividade anammox.



Figura 1: Concentração afluyente e efluente dos compostos nitrogenados ( $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_2^-$ ) no RBS ao longo do tempo de operação

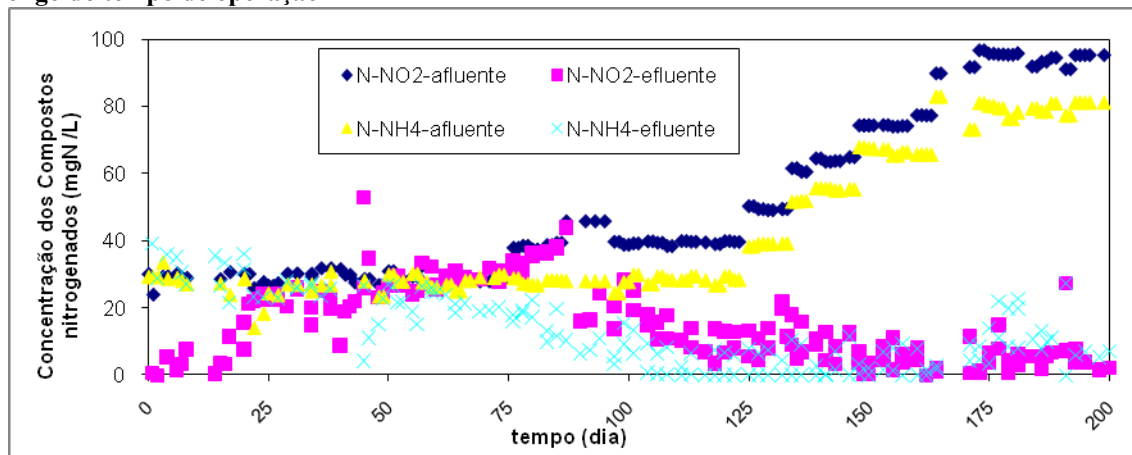


Figura 2: Eficiência de remoção de amônia e nitrito pelo lodo cultivado no RBS ao longo do tempo de operação.

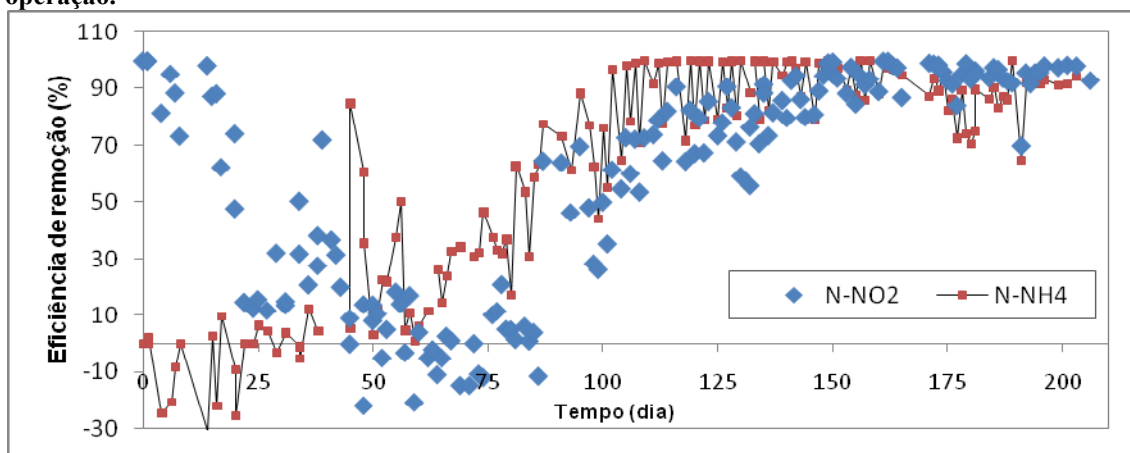
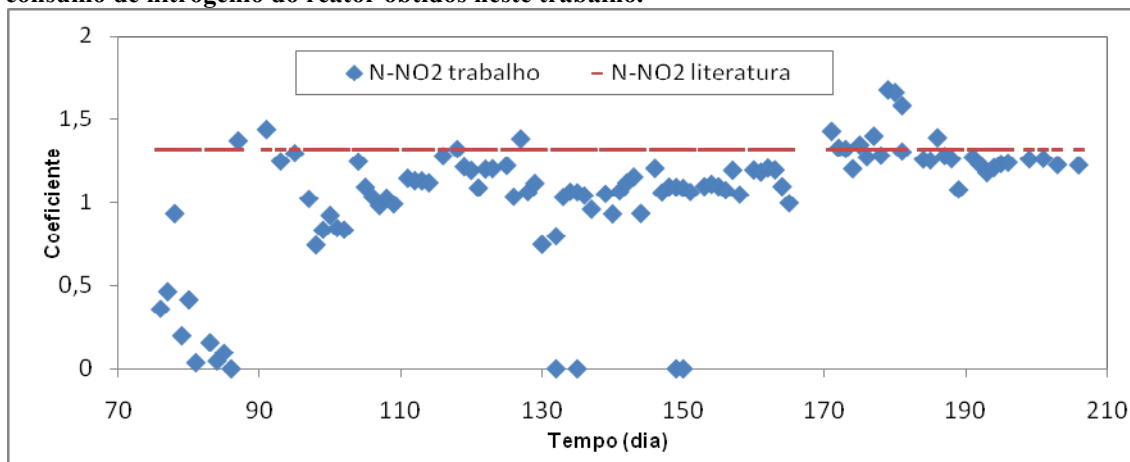


Figura 3: Coeficiente estequiométrico do nitrito em relação à amônia, de acordo com os dados de consumo de nitrogênio do reator obtidos neste trabalho.

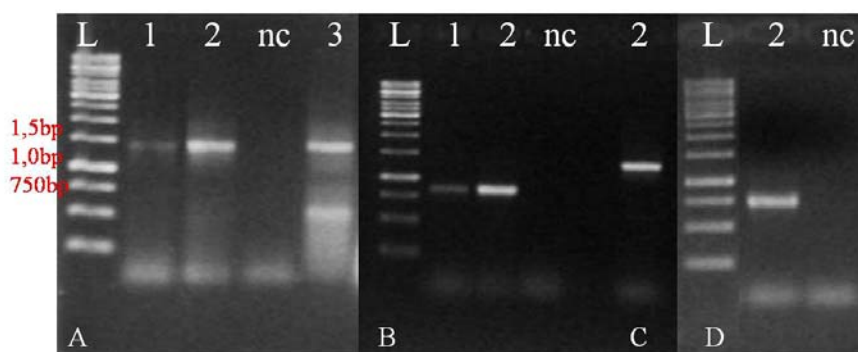




## RESULTADOS DA PCR

Os resultados da PCR com iniciadores específicos para as anammox demonstraram a presença de DNAr 16S dessas bactérias tanto no lodo de inóculo, quanto no lodo enriquecido no RBS após 181 dias de cultivo em meio autotrófico e anaeróbico (Figura 4). Uma vez que o DNA da biomassa cultivada apresentou produto de PCR com a mesma intensidade do produto amplificado a partir do DNA do lodo ativado (usado como inóculo), e o controle negativo (sem DNA), não apresentou qualquer sinal (Figura 4 painel A), pode-se sugerir que as bactérias anammox estavam presentes no lodo ativado antes do experimento de enriquecimento. Não obstante, em um experimento em batelada (realizado previamente a este trabalho), o lodo ativado não apresentou atividade anammox, mesmo após 370 dias de incubação em meio autotrófico e anaeróbico.

**Figura 4: Detecção pela PCR do DNAr 16S de anammox com iniciadores An7F e An1388R (painel A), específico para o grupo das anammox (*Brocadia*, *Kuenenia* e *Scalindua*), Pla46rc e Amx820 (painel B), Pla46rc e Amx1240 (painel C), e Pla46rc e Amx667r (painel D). L é o marcador de peso molecular (1Kb- Fermentas), (1) Lodo do RBS após 181 dias de enriquecimento (DNA diluído 10 vezes), (2) Lodo do RBS após 181 dias de enriquecimento (DNA concentrado), (3) Lodo ativado usado como inóculo no RBS; nc é o controle negativo da reação de PCR (sem DNA). Para a especificidade dos iniciadores, consultar a Tabela 1.**

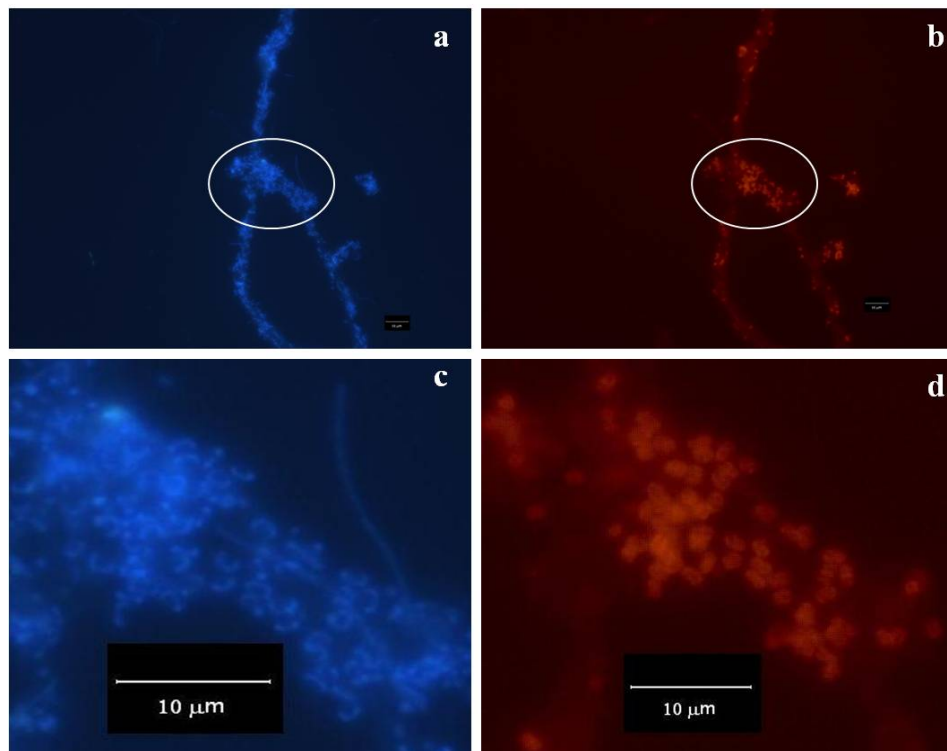


## RESULTADOS DO FISH

As análises de FISH, não revelaram a presença de bactérias anammox no lodo de inóculo, indicando que elas poderiam estar presentes, mas em concentração muito baixa (abaixo do limite de detecção da técnica, cerca de  $10^3$  a  $10^4$  células/ml). Não obstante, os resultados com a amostra do lodo enriquecido no RBS após 181 dias de cultivo, revelaram a presença de bactérias anammox, que hibridaram com as sondas Amx820 (dados não apresentados) e Amx1240 (Figura 5), confirmando o enriquecimento de bactérias anammox (provavelmente *Brocadia anammoxidans*) neste lodo. A quantificação dessas bactérias, através da contagem do número de células hibridadas com a sonda Amx1240, revelou que 53% do total de células do enriquecimento eram bactérias anammox. Conforme descrito previamente para Candidatus *B. anammoxidans* (STROUS 2000), as células de anammox enriquecidas no presente trabalho também apresentaram morfologia arredondada, e uma região escura (quase sem fluorescência) no centro da célula (Figuras 5c e 5d, respectivamente). Esta área central, ausente de ribossomos e de DNA (pois não corou com DAPI), deve ser presumivelmente uma região rica em proteína similar ao anammoxossomo de *B. anammoxidans*. É importante observar também, que no lodo enriquecido foram encontradas bactérias filamentosas coexistindo com as anammox (Figuras 5a e 5c). Não foi verificado sinal de hibridação positivo com as sondas Nso1225 (específica para as oxidadoras aeróbicas de amônia), Nit3 (detecta *Nitrobacter*) e Ntspa662 (detecta *Nitrospira*), indicando que estas bactérias não estavam presentes na biomassa enriquecida.



Figura 5: Análise de FISH da biomassa cultivada no RBS após 181 dias de enriquecimento. a e c- amostras coradas com DAPI; b e d-amostras hibridadas com a sonda Amx1240 (específica para *Brocadia anammoxidans*). A área central nas figuras a e b (marcadas com um círculo) foram ampliadas e são apresentadas nas figuras c e d, respectivamente. Observe a região mais escura no centro das células (indicando que não corou com DAPI e nem com a sonda). A barra nas imagens a e b representa 10  $\mu$ m.



## CONCLUSÕES

O lodo aeróbio proveniente de um sistema de lodos ativados tratando esgotos domésticos foi um bom inóculo para se obter e enriquecer as bactérias anammox, apesar de não possuir previamente atividade anammox. Esse lodo desenvolveu atividade anammox após 90 dias de cultivo em meio autotrófico e anaeróbio em reator batelada seqüencial (RBS).

A presença das anammox foi confirmada através do FISH com as sondas Amx820 e Amx1240, indicando provavelmente que são bactérias do gênero *Brocadia*. Não obstante, a identificação filogenética precisa a partir do sequenciamento e análise comparativa do DNAr 16S desta cultura de anammox, deverá ser realizada. A operação do RBS por mais tempo permitirá desenvolver uma população maior de bactérias anammox, capaz de crescer e suportar concentrações altas de nitrogênio. Posteriormente essa cultura poderá ser usada no tratamento de efluentes contendo altas concentrações de nitrogênio amoniacal.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo CNPq através do Edital Universal (471830/2006-2), FAPEMIG (projeto: TEC 946-06), e FINEP (projeto: MicrobUFMG-144). Os autores agradecem também o apoio da COPASA em fornecer o lodo ativado proveniente da ETE Arrudas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, J.C.; CHERNICHARO, C.A.L. (2007) Detection of Anaerobic Ammonium-oxidizing bacteria in different sludges and in a landfill leachate sample. PROCEEDINGS OF THE 11TH WORLD CONGRESS ON ANAEROBIC DIGESTION (AD11), Brisbane, Austrália, 23-27 de Setembro.



2. CHAMCHOI N., NITISORAVUT S. (2007) ANAMMOX enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere*, 66, 2225-2232.
3. DAIMS H, NIELSEN PH, NIELSEN JL, JURETSCHKO S, WAGNER M (2000) Novel Nitrospirilla-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water Sci Tech* 41:85-90.
4. DAPENA-MORA, A., VAN HULLE, S.W.H., CAMPOS, J.L., MENDEZ, R., VAN ROLLEGHEM, P.A., JETTEN, M. (2004) Enrichment of anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modeling results. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 79:1421-1428.
5. EGLI, K., FANGER, U., ALVAREZ, P.J.J., SIEGRIST, H., VAN DER MEER, J.R., ZEHNDER, A.J.B. (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* 175: 198-207.
6. EGLI K., LANGER C., SIEGRIST H-R, ZEHNDER A.J.B., WAGNER, M. AND VAN DER MEER, J.R. (2003). Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3213-3222.
7. KARTAL B, RATTRAY J, VAN NIFTRIK LA, VAN DE VOOSSENBERG J, SCHMID MC, WEBB RI, SCHOUTEN S, FUERSTE J., DAMSTE JS, JETTEN MJM, STROUS M (2006) Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 30:39-49.
8. MOBARRY BK, WAGNER M, URBAIN V, RITTMANN BE, STAHL DA (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62:2156-2162.
9. MULDER, A., VAN DE GRAAF A.A., ROBERTSON, L.A., KUENEN, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 177-184.
10. PENTON CR, DEVOL AH, TIEDJE JM (2006) Molecular Evidence for the Broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in Freshwater and Marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 72:6829-6832.
11. QUAN Z-X, RHEE S-K, ZUO J-E, YANG Y, BAE J-W, PARK JR, LEE S-T, PARK Y-H (2008) Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environ Microbiol* 10: 3130-3139.
12. SCHMID M, TWACHTMANN U, KLEIN M, STROUS M, JURETSCHKO S, JETTEN MSM, METZGER J, SCHLEIFER K-H, WAGNER M (2000) Molecular Evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol* 23:93-106.
13. SCHMID M, MAAS B, DAPENA A, VAN DE PAS-SCHOONEN K, VAN DE VOOSSENBERG J, KARTAL B, VAN NIFTRIK L, SCHMIDT I, CIRPUS I, KUENEN JG, WAGNER M, SINNINGHE DAMSTE JS, KUYPERS M, REVSBECH NP, MENDEZ R, JETTEN MSM, STROUS M (2005) Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71:1677-1684.
14. STROUS M, HEIJNEN JJ, KUENEN JG, JETTEN MSM (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol Biotechnol* 50:589-596.
15. STROUS M. (2000) Microbiology of anaerobic ammonium oxidation. PhD thesis, Technical University Delft (The Netherlands).
16. THIRD KA, PAXMAN J, SCHMID M, STROUS M, JETTEN MSM, CORD-RUWISCH R (2005) Enrichment of Anammox from Activated sludge and its application in the CANON Process. *Microb Ecol* 49:236-244.
17. VAN DE GRAAF AA, DE BRUIJN P, ROBERTSON LA, JETTEN MSM, KUENEN JG (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor *Microbiol.* 142:2187-2196
18. VAN DER STAR WRL, ABMA WR, BLOMMERS D, MULDER J-W, TOKUTOMI T, STROUS M, PICIOREANU C, VAN LOOSDRECHT MCM (2007) Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Wat. Res.* 41:4149-4163.
19. VAN DONGEN U, JETTEN MSM, VAN LOOSDRECHT MCM (2001) The SHARON-anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Wat. Sci. Technol* 44:153-160.
20. WAGNER M, RATH G, KOOPS H-P, FLOOD J, AMANN R (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci Tech* 34:237-244.