

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL**

**PROCESSO ANAMMOX NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO  
DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS - AVALIAÇÃO DE SISTEMAS  
EM ESCALA DE BANCADA**

**GENILDA MARIA DE OLIVEIRA**

**ORIENTADORA: ARIUSKA KARLA BARBOSA AMORIM**

**TESE DE DOUTORADO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL E  
RECURSOS HÍDRICOS**

**PUBLICAÇÃO: PTARH.TD – 016/2015**

**BRASÍLIA/DF: NOVEMBRO - 2015**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL**

**PROCESSO ANAMMOX NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE  
ÁGUAS RESIDUÁRIAS - AVALIAÇÃO DE SISTEMAS EM ESCALA  
DE BANCADA**

**GENILDA MARIA DE OLIVEIRA**

TESE DOUTORADO SUBMETIDA AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM TECNOLOGIA AMBIENTAL E RECURSOS HÍDRICOS.

APROVADA POR:

---

Profª. Ariuska Karla Barbosa Amorim, Doutora (ENC-UnB)  
(Orientadora)

---

Profª. Lenora Nunes Ludolf Gomes, Doutora (ENC-UnB)  
(Examinadora Interna)

---

Prof. Marco Antonio Almeida de Souza, PhD (ENC-UnB)  
(Examinador Interno)

---

Profª. Silvana de Queiroz Silva, PhD (ICEB-UFOP)  
(Examinadora Externa)

---

Prof. Marcos von Sperling, PhD (DESA-UFMG)  
(Examinador Externo)

**BRASÍLIA/DF, NOVEMBRO DE 2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, GENILDA MARIA DE

Processo anammox na remoção de nitrogênio de águas residuárias - Avaliação de sistemas em escala de bancada. xxix, 208p., 210 x 297 mm (ENC/FT/UnB, Doutor, Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, 2015).

Tese de Doutorado – Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia.

Departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

1. Anammox

2. Reator em bateladas

3. Inóculo

4. Remoção de Nitrogênio

I. ENC/FT/UnB

II. Título (série)

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

OLIVEIRA, G. M. (2015). Processo anammox na remoção de nitrogênio de águas residuárias - Avaliação de sistemas em escala de bancada. Tese de Doutorado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação DTARH.TD - 016/2015, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 207p.

## CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Genilda Maria de Oliveira.

TÍTULO: Processo anammox na remoção de nitrogênio de águas residuárias - Avaliação de sistemas em escala de bancada.

GRAU: Doutor

ANO: 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte dessa tese de doutorado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

---

Genilda Maria de Oliveira

SQSW 305 Bloco L apto 510, Sudoeste, Brasília, DF

genilda@iftm.edu.br ou genilda.oliveira@ifb.edu.br

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de tese a todos os meus familiares e amigos e de uma forma especial ao meu companheiro *Miron Rebis Vilarinho Segundo*, pelo carinho, compreensão, amor e por tudo que deixamos de *viver* enquanto a tese estava em execução.

***Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu:***

*Há tempo de nascer, e tempo de morrer;  
tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;*

*Tempo de matar, e tempo de curar;  
tempo de derrubar, e tempo de edificar;*

*Tempo de chorar, e tempo de rir;  
tempo de prantear, e tempo de dançar;*

*Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;  
tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;*

*Tempo de buscar, e tempo de perder;  
tempo de guardar, e tempo de lançar fora;*

*Tempo de rasgar, e tempo de coser;  
tempo de estar calado, e tempo de falar;*

*Tempo de amar, e tempo de odiar;  
tempo de guerra, e tempo de paz.*

***Que proveito tem o trabalhador naquilo em que trabalha?***

*Eclesiastes 3:1-9*

***Agora é tempo de agradecer:***

À Deus, base da minha Força e Coragem. “*Deus que faz as cruces faz também os ombros. Ninguém o iguala na arte das proporções*” (P. Prin).

À Professora Ariuska, agradeço pela confiança ao aceitar-me como sua primeira orientanda de doutorado e pela oportunidade em permitir-me desenvolver as habilidades em pesquisas e inovações, elaboração de projetos visando financiamentos, nas co-orientações de TCC e ICs. Obrigada pela compreensão nos meus momentos de incertezas.

À Professora Cristina Brandão, minha Conselheira, um exemplo de dedicação e paixão pela Academia e de moral e compromisso com a ciência de qualidade.

Ao Professor Koide, mais do que um Professor, outro exemplo de desprendimento, moral e compromisso. Aprendi muito com nossas conversas sobre a vida, o mundo administrativo da academia, sobre política e, lógico, sobre Engenharia. Obrigada por todo o apoio financeiro.

Aos membros da Banca Examinadora, à Professora Cynthia Kyaw, minha admiração e agradecimento. À Professora Lenora, agradeço pelas discussões e por descomplicar a biologia molecular. Aos Professores Silvana Queiroz, Marcos von Sperling e Marco Antonio Almeida de Souza pelas valiosas contribuições na discussão da tese.

Aos professores do PTARH, Nestor (Compromisso e Responsabilidade), Yovanka (pela amizade e discussões de métodos analíticos), Oscar (Diplomacia), Marco Antônio (pela dedicação e por abrir a sua casa para as festas tão animadas do PTARH), Ricardo Bernardes (Ciência e Filosofia), aprendi muito com cada um de vocês. Ao Carlos, Conceição e Dirceu, ainda que pelos corredores do PTARH, também fizeram parte da minha formação.

Ao amigo Leonardo Damasceno que me incentivou a buscar um Programa de Pós-Graduação que me faria uma profissional com verdadeira competência técnica.

Aos Órgãos Financiadores, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica pela bolsa de doutorado (Programa PIQDTEC - Edital 02/2008). Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPq (Edital MCT/CNPq N° 014/2010 - Universal) e ao Decanato de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade de Brasília (Edital DPP 09/2011), pelo apoio

financeiro.

Ao IFTM, Campus Uberlândia, em nome dos seus Diretores Ruben Carlos Benvenuto Minussi (Gestão 2008-2012) e Ednaldo Coutinho (Gestão 2012-2015) pelo apoio e liberação para Capacitação. A Zilda Correa de Lacerda e Carlos Alberto Alves de Oliveira que foram responsáveis pelos trâmites e acompanhamento do doutorado junto ao IFTM e à CAPES.

À CAESB, representada por Cinthia Mesquita Pinke Cavalcanti e Karina Ferraz Ferro Costa, pela realização das análises de íons em cromatografia iônica.

Ao amigo José Flávio, que dividiu comigo a árdua tarefa da coleta dos lodos nos Frigoríficos São Pedro e Luciana e os “carrapatos”. Ficarei devendo você para sempre. Muito obrigada.

Ao pessoal dos Frigoríficos Luciana, São Pedro e Mataboi pela cessão dos inóculos utilizados nos experimentos.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UnB, Junior (pelas idas e coletas de chorume no aterro Jockey Clube e pelas soluções no desenvolvimento experimental), Marcilene (não teria conseguido terminar sem a sua ajuda, muito obrigada!), Carla (pelo carinho e ajuda na otimização do espaço e discussão sobre as análises de biologia molecular), ao Dênio e Sara (pela ajuda nas análises de cromatografia iônica), ao Antônio (Boy) e ao James pelo convívio e ajuda no laboratório.

Ao meu irmão Gilson Peixoto de Oliveira que ajudou a projetar e desenvolveu os reatores imprescindíveis para os experimentos. Aos meus pais, Valdemar e Maria do Rosário, que adaptaram suas rotinas para tornar minhas idas e vindas a Brasília mais fáceis. A minha irmã Gislene A. de Oliveira Arantes pela revisão do texto. Ao meu marido, Miron Rebis Vilarinho Segundo, que também ajustou sua rotina para me ajudar no deslocamento em Brasília, pelas inúmeras vezes que me fez companhia no laboratório (LAA) nos finais de semana e feriados, pelo alívio nos afazeres de casa. Às amigas Orlandina e Ana Maria Mota pelo companheirismo e ajuda nas análises de biologia molecular.

Aos amigos que se fizeram no PTARH: Bruna, Elisa, Jackeline, Marcilene, Carla, Olga, Arthur, Eduardo, Larissa, Aline, Lucas, Janícia, Welliton, também não teria conseguido sem vocês, obrigado pelo companheirismo e pelos inúmeros momentos de descontração. Aos amigos de Uberlândia, Marilda, Luciana Pinto, Sérgio, Firmino, Letícia, Deborah, Antônio

Cesar, Reginaldo, Zilda, Carlos DJ por ajudarem a manter-me firme nos meus ideais de Escola.

À minha família Oliveira & Vilarinho, sem o apoio, torcida e carinho de vocês não teria forças e razões para lutar. Amo vocês.



## **RESUMO**

### **PROCESSO ANAMMOX NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS - AVALIAÇÃO DE SISTEMAS EM ESCALA DE BANCADA**

**Autora: Genilda Maria de Oliveira**

**Orientadora: Ariuska Karla Barbosa Amorim**

**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos**

**Brasília, 06 de novembro de 2015.**

O controle e tratamento de águas residuárias são os principais mecanismos para evitar o aporte de nitrogênio aos ecossistemas aquáticos. Esse nutriente em altas concentrações ocasiona problemas ambientais e de saúde pública. O processo anammox, realizado por bactérias anaeróbias que oxidam a amônia usando o nitrito comoceptor final de elétrons, apresenta-se com potencial promissor para a remoção de nitrogênio de águas residuárias, devido à redução dos custos comparado ao processo convencional de tratamento, composto pelas etapas de nitrificação e desnitrificação heterotrófica. No Brasil, deve-se buscar fontes de inóculos e estudar as condições para o estabelecimento do processo anammox para quando esse mecanismo de remoção de nitrogênio tornar-se uma alternativa de tratamento viável tecnicamente. Nesse sentido, foram objetivos desse trabalho fornecer informações sobre fontes de inóculos, enriquecimento de micro-organismos e ativação de biomassa para partida de sistemas em bateladas visando remoção biológica de amônia pelo processo anammox. Foram testadas 6 fontes de inóculos, oriundas de lodos de sistemas tratando efluentes de abatedouros de bovinos e suínos, sedimentos do Lago Paranoá e da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília DF, em reatores operados por bateladas em escala de bancada, usando água residuária sintética acrescida de concentrações crescentes dos substratos amônia e nitrito. Durante 120 dias, os sistemas foram ajustados para promoção do enriquecimento da biomassa anammox. Posteriormente testaram-se os sistemas para avaliação da atividade anammox. Sugere-se a presença de micro-organismos anammox, verificados por PCR e por sequenciamento dos fragmentos amplificados dos genes para o RNAr 16S, nas biomassas provenientes do sedimento do lago Paranoá, Brasília DF, dos lodos das lagoas anaeróbia e facultativas tratando efluentes de abatedouros. Ocorreu o aumento da concentração de cópias de fragmentos do gene para RNAr 16S, avaliados por PCRq após os 120 dias, indicando o enriquecimento da biomassa

anammox. As condições estabelecidas para os sistemas biológicos parecem selecionar o mesmo grupo de bactérias anammox, independentemente da origem da biomassa, possivelmente havendo substituição de dominância dos grupos de bactérias anammox inicialmente presentes. Os índices de similaridades, calculados por comparações entre as sequências de nucleotídeos obtidas nesse estudo com aquelas de candidatas espécies anammox depositadas no *Genbank* utilizando o *BLAST*, indicam que os micro-organismos presentes nos sistemas testados pertencem à Ordem Brocadiales. Limitação de nitrito pode interferir no sucesso do processo, uma vez que as bactérias anammox têm menor afinidade por esse substrato do que as nitratantes e heterotróficas desnitrificantes. Em todos os sistemas biológicos testados o metabolismo anammox não foi exclusivo, uma vez que não foram atingidos os índices estequiométricos esperados. Nos sistemas biológicos ocorreu a concomitância dos processos metabólicos anammox, nitrificação, nitratação e desnitrificação heterotrófica. Os inóculos utilizados e/ou as condições estabelecidas nesse estudo não favoreceram a redução do tempo de partida nos sistemas biológicos, sendo necessários mais de 200 dias de operação para enriquecimento e estabilidade do processo anammox.

**Palavras-Chaves: Anammox, fonte de inóculos, culturas em bateladas, tempo de partida, nitrogênio.**

## **ABSTRACT**

### **ANAMMOX PROCESS IN NITROGEN REMOVAL FROM WASTEWATER - EVALUATION OF SYSTEMS IN BENCH SCALE**

**Author: Genilda Maria de Oliveira**

**Supervisor: Ariuska Karla Barbosa Amorim**

**Graduate Program in Environmental Technology and Water Resources**

**Brazil, Brasilia, November 2015.**

The control and treatment of wastewater are the main mechanisms to prevent the nitrogen supply to aquatic ecosystems. This nutrient in high concentrations causes environmental and public health problems. The anammox process, carried out by anaerobic bacteria that oxidize ammonia using nitrite as a final electron acceptor, is presented with promising potential for the removal of nitrogen from wastewater, due to its reduced costs compared to the conventional treatment process, which is composed of nitrification and heterotrophic denitrification stages. In Brazil, one must seek sources of inoculum and study the conditions for the establishment of anammox process when this nitrogen removal mechanism becomes a technically viable treatment alternative. In this sense, the objectives of this study were to provide information on sources of inoculum, enrichment of microorganisms and activation of biomass for the startup of batch systems targeting biological removal of ammonia by anammox process. Six sources of inoculum were tested, derived from sludge systems treating wastewater from cattle and pig slaughterhouses, sediments from Paranoa Lake and from the leachate accumulation lake of the controlled landfill Jockey Club of Brasilia DF, in reactors operated by batch in bench scale, using synthetic wastewater together with increasing concentrations of substrates ammonia and nitrite. For 120 days, the systems were adjusted for promoting the enrichment of anammox biomass. Afterwards, the systems for evaluation of anammox activity were tested. It is suggested the presence of anammox microorganisms, checked by PCR and sequencing of the amplified fragments of the genes for 16S rRNA from biomass in the lake Paranoa sediment, Brasilia DF, the sludge of anaerobic and facultative lagoons treating effluent from slaughterhouse. There was an increase in the concentration of copies of gene fragments for 16S rRNA, evaluated by PCRq after 120 days, indicating enrichment of anammox biomass. The conditions developed for the biological systems seem to select the same group of anammox bacteria, regardless of

their biomass origin, possibly having replacement of the anammox bacteria groups initially present. The levels of similarity, calculated by comparing the nucleotide sequences obtained in this study with those of candidate species anammox deposited in Genbank using the BLAST, indicate that microorganisms present in the tested systems belong to the Order Brocadiales. Limitation of nitrite may interfere with the success of the process, since the anammox bacteria has lower affinity for this substrate than nitrite oxidizers and heterotrophic denitrifiers. In all the biological systems that were tested, anammox metabolism was not unique, since the expected stoichiometric ratio was not achieved. In the biological systems, there was the concurrence of anammox metabolic processes, nitritation, nitrification and heterotrophic denitrification. The inoculum used and / or the conditions established in this study did not favor the reduction of the startup time of biological systems, requiring more than 200 days of operation for enrichment and stability of the anammox process.

**Keywords: Anammox, source of inoculum, batch cultures, startup time, nitrogen.**

## SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
SUMÁRIO	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS E ABREVIACÕES	xxiii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. OBJETIVOS .....	05
2.1. OBJETIVO GERAL .....	05
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	06
3.1. PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO ...	06
3.2. INÓCULOS PARA PROCESSO ANAMMOX .....	16
3.3. MICRO-ORGANISMOS ENVOLVIDOS NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO .....	25
3.4. PARÂMETROS DE CONTROLE PARA O PROCESSO ANAMMOX	41
3.5. DETECÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS .....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	57
4.1. DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS .....	58
4.1.1. Reatores: concepção e desenvolvimento .....	58
4.1.2. Água Residuária Sintética e Substratos .....	61
4.1.3. Fonte dos inóculos .....	63
4.2. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL .....	69
4.2.1. Preparação dos Inóculos .....	69
4.2.2. ETAPA 1: Aclimação e Enriquecimento de Micro-Organismos ...	69
4.2.2.1. Coleta de Biomassa para análises de biologia molecular .....	73
4.2.3. ETAPA 2: Comportamento de Conversão dos Compostos Nitrogenados .....	73
4.2.3.1. Coleta de Biomassa para análises de biologia molecular .....	73
4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	76
4.3.1. Preparação e conservação das amostras do licor misto para análises e cromatografia iônica .....	76
4.3.2. Análises dos componentes nitrogenados e de outros íons .....	77
4.3.3. Análises de biologia molecular para avaliação dos micro-organismos .....	78
4.3.3.1. Da extração do DNA Genômico .....	78
4.3.3.2. Análises PCR convencional e Sequenciamento .....	79
4.3.3.3. Análises de PCR quantitativa .....	82
4.4. TRATAMENTO DOS DADOS .....	85
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	93
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS AMBIENTAIS UTILIZADOS	

COMO FONTE DE INÓCULOS .....	93
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS INÓCULOS .....	98
5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS MICRO-ORGANISMOS ANAMMOX NAS ETAPAS 1 E 2 .....	105
5.3.1. Etapa 1 – enriquecimento dos micro-organismos responsáveis pelo processo anammox .....	106
5.3.1.1. Comportamento de conversão dos íons nitrogenados .....	106
5.3.1.2. Variações do pH do licor dos sistemas biológicos .....	114
5.3.1.3. Comportamento da biomassa quanto aos íons sulfato e fosfato .....	116
5.3.1.4. Caracterização da biomassa nos sistemas biológicos após 120 dias .....	121
5.3.1.5. Afiliações filogenéticas por comparações às sequências anammox depositadas no GenBank .....	129
5.3.2. Etapa 2 – comportamento de conversão dos compostos nitrogenados .....	135
5.3.2.1. Avaliação dos sistemas biológicos operados em duplicatas ...	136
5.3.2.2. Comportamento de conversão dos íons amônia (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ), nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) e nitrato (NO <sub>3</sub> ) pela comparação à relação estequiométrica pelo processo anammox .....	139
5.3.2.3 Teste de Kruskal-Wallis comparando as relações estequiométricas anammox obtidas nos sistemas biológicos .....	150
5.3.2.4. Variações do pH do licor misto durante a 2 <sup>a</sup> etapa .....	154
5.3.2.5. Análises de biologia molecular da biomassa nos sistemas biológicos após 180 dias (final da 2 <sup>a</sup> etapa) .....	157
6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	166
APÊNDICE I	CD
APÊNDICE II	CD
APÊNDICE III	CD
APÊNDICE IV	CD
APÊNDICE V	CD
APÊNDICE VI	CD
APÊNDICE VII	CD
APÊNDICE VIII	CD

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Custo estimado (R\$/Kg N) para remoção de nitrogênio amoniacal de águas residuárias por meio de diferentes processos .....	16
Tabela 3.2: Inóculos e sistemas usados para enriquecimento e atividade anammox .....	23
Tabela 3.3: Situação do sequenciamento de genes codificadores do RNAr 16S de bactérias anammox para inferências filogenéticas .....	33
Tabela 3.4: Caracterização de bactérias anammox em sistemas biológicos para remoção de nitrogênio, com base no RNAr 16S .....	34
Tabela 3.5: Condições que promovem a ocorrência dos processos biológicos relacionados ao ciclo do nitrogênio .....	42
Tabela 3.6: <i>Primers</i> desenhados com base nos genes para o RNAr 16S utilizados nas técnicas moleculares de amplificação do material genético dos organismos anammox .....	53
Tabela 3.7: Razão estequiométrica entre amônia, nitrito e nitrato durante atividade anammox em sistemas biológicos .....	55
Tabela 4.1: Soluções de macro e micronutrientes da água residuária sintética utilizada nas etapas experimentais .....	62
Tabela 4.2: Soluções com os substratos utilizados nas etapas experimentais .....	63
Tabela 4.3: Inóculos usados nos experimentos em bateladas para enriquecimento de organismos anammox .....	68
Tabela 4.4: Parâmetros e metodologias usadas para caracterização nas diferentes amostras inoculadas nas culturas em bateladas para enriquecimento anammox .....	69
Tabela 4.5: Conjunto de pares de <i>primers</i> utilizados para detecção de micro-organismos anaeróbios (anammox) e aeróbios (nitritantes e nitratantes) oxidadores de amônia .....	80
Tabela 4.6: Condições de amplificações utilizadas com os pares de primers para detecção de micro-organismos aeróbios (nitritantes) e anaeróbios (anammox) oxidadores de amônia .....	80
Tabela 4.7: <i>Primers</i> utilizados e temperatura de anelamento adotados nas análises de PCR quantitativa .....	83

Tabela 4.8: Combinações de comparações realizadas entre as amostras de DNA genômico dos sistemas biológicos por análise de PCR quantitativa .....	83
Tabela 5.1: Amostras de lodo utilizadas como inóculos nos experimentos de enriquecimento e atividade anammox .....	93
Tabela 5.2: Avaliação das características químicas dos ambientes utilizados como fonte de inóculos nos experimentos para enriquecimento e atividade anammox .....	95
Tabela 5.3: Composição dos sólidos nos lodos e sedimentos utilizados nos sistemas biológicos testados .....	96
Tabela 5.4: Avaliação do rendimento do DNA genômico extraído da biomassa dos seis inóculos utilizados nos sistemas biológicos para enriquecimento anammox .....	99
Tabela 5.5: Resultados das amplificações por PCR das biomassas obtidas a partir do inóculos testados nos sistemas biológicos .....	101
Tabela 5.6: Comparação das duplicatas A e B dos sistemas biológicos na conversão dos íons amônia, nitrito e nitrato pelos testes estatísticos: 1) teste <i>t</i> para amostras dependentes para $p < 0,05$ e 2) teste não paramétrico de Wilcoxon de Postos com Sinais para $p < 0,05$ .....	107
Tabela 5.7: Resultados de amplificações por PCR usando par de <i>primers</i> Pla 46F e Amx 820R, nos diferentes lodos antes e após o período para enriquecimento anammox .....	122
Tabela 5.8: Análise dos sistemas biológicos A e B para verificação da igualdade estatística entre duplicata na conversão dos íons nitrogenados .....	138
Tabela 5.9: Correlações entre produção de nitrato_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito_N (mM) nos sistemas biológicos, dada pelo valor de $R^2$ calculado .....	145
Tabela 5.10: Resultados das amplificações para fragmentos de DNA por PCR para bactérias anammox, nitritantes como <i>Nitrosomonas</i> e nitratantes como <i>Nitrobacter</i> .....	158
Tabela 5.11: Ciclos de quantificação obtidos por PCR quantitativa para os sistemas biológicos aos 120 dias relativos às condições de operação da etapa 1 e aos 180 dias relativos às condições de operação da etapa 2, destinadas ao enriquecimento e atividade dos organismos anammox .....	160



## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Fluxograma mostrando o processo de nitrificação parcial seguido por desnitrificação .....	08
Figura 3.2: Fluxograma mostrando a conversão desejada de amônia por meio do processo SHARON .....	08
Figura 3.3: Fluxograma mostrando que no processo CANON em um único reator a amônia pode ser convertida em nitrogênio gasoso e nitrato .....	09
Figura 3.4: Fluxograma mostrando que o processo NO <sub>x</sub> é ativado pela presença de pequenas concentrações de óxidos de nitrogênio .....	10
Figura 3.5: Fluxograma do sistema patenteado (US007267764B2) para remoção das formas nitrogenadas e carbonáceas de águas residuária .....	11
Figura 3.6: A) Grânulos da biomassa com as bactérias aeróbias oxidantes de amônia, as anaeróbias oxidantes de amônia e as desnitrificantes. B) Grânulos com diâmetro médio de 5mm (Wang <i>et al.</i> , 2010) .....	11
Figura 3.7: Fluxograma mostrando o processo DEAMOX. Adaptado de Bagchi <i>et al.</i> (2012) .....	12
Figura 3.8: Fluxograma mostrando o processo BABE. Adaptado de Bagchi <i>et al.</i> (2012) .....	13
Figura 3.9: Fluxograma mostrando que numa relação molar aproximada de 1:1 entre amônia e nitrito por meio do processo ANAMMOX é possível a oxidação anaeróbia da amônia .....	13
Figura 3.10: Principais estados de oxidação do nitrogênio e processos biológicos possíveis para a oxidação e/ou redução .....	26
Figura 3.11: Ciclagem do nitrogênio conduzida por micro-organismos por catabolismo (setas pontilhadas) e anabolismo (setas cheias) .....	27
Figura 3.12: Oxidação da amônia e fluxo de elétrons em bactérias oxidadoras de amônia .....	29
Figura 3.13: Oxidação de nitrito a nitrato por bactérias nitrificantes .....	30
Figura 3.14: Árvore filogenética da Classe Planctomycetia dividida em duas prováveis ordens, baseada na sequência dos genes que codificam o RNAr 16S, Fonte: Jogler <i>et al.</i> , 2012 .....	32
Figura 3.15: A: Micrografia de células em forma de cocos presentes nas	

culturas enriquecidas anammox. B: Micrografia eletrônica de biomassa suspensa de micro-organismos anammox .....	33
Figura 3.16: Ultraestrutura da bactéria anammox “ <i>Candidatus</i> <i>Kuenenia stuttgartiensis</i> ” .....	36
Figura 3.17: Mecanismos metabólicos possíveis e localização celular do sistema de enzimas envolvido na oxidação anaeróbia de amônia .....	38
Figura 3.18: Catabolismo Hipotético e a reversão na cadeia transportadora de elétrons no anamoxossomo, estrutura celular das bactérias anammox .....	39
Figura 3.19: Árvore Filogenética de organismos relacionados ao ciclo do nitrogênio baseada em sequências de genes do RNA ribossomal 16S (Vlaeminck <i>et al.</i> , 2011) .....	40
Figura 4.1: Desenho experimental do trabalho .....	58
Figura 4.2: A) reator desenvolvido para estabelecimento dos sistemas biológicos B) sistema composto por dois reatores (1: com água para dissolução de gases e 2: biomassa, meio sintético e substratos nitrogenados) .....	59
Figura 4.3: A) Localização das válvulas de alimentação e descarte dos reatores; B) Componentes utilizados na produção dos reatores; C) Válvula para escape dos gases produzidos nos sistemas biológicos .....	60
Figura 4.4: A) Reator para dissolução dos gases com canículo afogado e mangueira conexão dos sistemas; b) válvula <i>stopflow</i> para manobras de controle durante operação dos sistemas .....	61
Figura 4.5: Lagoa anaeróbia tratando efluente de abatedouro de suínos. A) vista da lagoa anaeróbia. B) Aspecto do lodo coletado no fundo da lagoa anaeróbia .....	67
Figura 4.6: Lagoa de acumulação de chorume localizada no aterro Jockey Club de Brasília, DF .....	67
Figura 4.7: Reatores inoculados com diferentes biomassas acoplados com os vasos para dissolução dos gases e na base agitadora em sala climatizada .....	70
Figura 4.8: Operação dos sistemas biológicos em bateladas sequencias na ETAPA 1, destinada à aclimação e enriquecimento de micro-organismos anammox .....	71
Figura 4.9: Sistema composto por duas peças para verificação e quantificação dos gases .....	72

Figura 4.10: Operação dos sistemas biológicos em bateladas sequencias na ETAPA 2, destinada a avaliação das conversões dos compostos nitrogenados	75
Figura 4.11: Configuração da placa do PCR quantitativo utilizada para cada par de iniciadores ( <i>primers</i> ) testados .....	84
Figura 5.1: Correlação entre o ciclo de quantificação e a concentração de cópias dos genes de interesse quando obtidos os Cq pela análise de PCRq .....	103
Figura 5.2: Ciclo de quantificação (Cq) obtidos pela análise de PCR quantitativos, testando quatro pares de primers .....	104
Figura 5.3. Desempenho dos sistemas biológicos com inóculo proveniente de sedimentos do lago Paranoá, Brasília/DF (Par) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	107
Figura 5.4: Desempenho dos sistemas biológicos com inóculo proveniente de lodo de lagoa anaeróbia tratando efluente de frigorífico 1, Araguari/MG (AnF1) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	109
Figura 5.5: Desempenho dos sistemas biológicos com inóculo proveniente de lodo de lagoa facultativa tratando efluente de frigorífico 1, Araguari/MG (FaF1) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	110
Figura 5.6: Desempenho dos sistemas biológicos com inóculo proveniente de lodo de lagoa facultativa tratando efluente de frigorífico 2, Uberlândia/MG (FaF2) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	110
Figura 5.7: Desempenho dos sistemas biológicos com inóculo proveniente de lodo reator UASB tratando efluente de frigorífico 2, Uberlândia/MG (UaF2) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	111
Figura 5.8: Desempenho dos sistemas biológicos com inóculo proveniente da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF (Cho) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	112
Figura 5.9: Variação do pH dos sistemas biológicos ao longo das bateladas	

durante a etapa 1 visando o enriquecimento da biomassa anammox .....	115
Figura 5.10: Concentrações dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com inóculo proveniente do sedimento do lago Paranoá, Brasília, DF (Par) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox ...	116
Figura 5.11: Concentrações dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com inóculo proveniente do lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG (AnF1) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	117
Figura 5.12: Concentrações dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com inóculo proveniente do lodo da lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG (FaF1) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	118
Figura 5.13: Concentrações dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com inóculo proveniente do lodo da lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG (FaF2) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	118
Figura 5.14: Comportamento dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com inóculo proveniente do reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia (MG) (UaF2) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	119
Figura 5.15: Comportamento da biomassa quanto aos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com inóculo proveniente da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília, DF durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox .....	120
Figura 5.16: Abundância de cópias dos genes de micro-organismos de interesse, usando quatro pares de <i>primers</i> , para levantamento do número de cópias de DNA de organismos relacionados ao Domínio <i>Bacteria</i> , bactérias anammox, oxidadoras aeróbias de nitrito e amônia, dados em escala logarítmica e empilhados .....	124
Figura 5.17: Concentrações de cópias de DNA relacionadas ao RNAr 16S de bactérias anammox nos sistemas biológicos antes e após o período de 120 dias com condições ajustadas para o desenvolvimento de micro-organismos anammox .....	125

Figura 5.18: Dendrograma comparativo da similaridade filogenética das biomassas obtidas a partir dos inóculos e dos sistemas biológicos após 120 dias em condições ajustadas para ocorrência do enriquecimento dos micro-organismos anammox .....	127
Figura 5.19: Concentrações de cópias de DNA relacionadas ao RNAr 16S de bactérias como <i>Nitrobacter</i> nos sistemas biológicos antes e após o período de 120 dias com condições ajustadas para o desenvolvimento de micro-organismos anammox .....	129
Figura 5.20: Dendrograma mostrando a afiliação filogenética das sequências obtidas a partir da biomassa dos inóculos e dos sistemas biológicos após 120 dias em condições ajustadas para ocorrência do enriquecimento dos micro-organismos anammox com sequências depositadas no <i>GenBank</i> a partir dos códigos para as candidatas a espécies anammox .....	131
Figura 5.21: Dendrograma mostrando a afiliação filogenética das sequências obtidas a partir da biomassa dos inóculos e dos sistemas biológicos após 120 dias em condições ajustadas para enriquecimento dos micro-organismos anammox com sequências depositadas no GenBank a com similaridades elevadas dada por comparações usando <i>BLAST</i> .....	133
Figura 5.22: Indicadores descritivos para o comportamento de conversão concomitante dos íons nitrito e amônia comparada à relação estequiométrica dada pelo processo anammox, usando-se os dados de 10 bateladas e 5 diferentes intervalos de tempo dentro de cada batelada .....	139
Figura 5.23: Indicadores descritivos para o comportamento de formação de nitrato a partir da redução concomitante dos íons nitrito e amônia comparada à relação estequiométrica dada pelo processo anammox, usando-se os dados de 10 bateladas e 5 diferentes intervalos de tempo dentro de cada batelada .....	141
Figura 5.24: Relação estequiométrica entre a formação de nitrato a partir da redução concomitante dos íons nitrito e amônia comparada à relação estequiométrica dada pelo processo anammox, usando-se os dados de 10 bateladas e 5 diferentes intervalos de tempo dentro de cada batelada .....	142
Figura 5.25: Relações estequiométrica entre as reduções concomitantes de nitrito e amônia nos intervalos de tempo A) T0_T1 (0 a 24 horas), B) T0_T2 (0 a 48 horas) e C) T0_T3 (0 a 72 horas) durante as 10 bateladas conduzidas	

na etapa 2 visando a atividade anammox .....	151
Figura 5.26: Relações estequiométrica entre a produção de nitrato com reduções concomitantes de nitrito e amônia nos intervalos de tempo A) T0_T1 (0 a 24 horas), B) T0_T2 (0 a 48 horas) e C) T0_T3 (0 a 72 horas) durante as 10 bateladas conduzidas na etapa 2 visando a atividade anammox .....	153
Figura 5.27: Variação do pH (em valores médios, n = 10) nos sistemas biológicos ao longo das bateladas de 72 horas durante a 2ª etapa experimental	155
Figura 5.28: Valores médios do pH inicial (0 horas) e final (72 horas) do licor dos sistemas biológicos ao longo das bateladas com duração de 72 horas realizados na 2ª etapa experimental .....	156
Figura 5.29: Abundância de cópias dos genes de micro-organismos de interesse nos inóculos utilizados nos sistemas biológicos ajustados para permitir o enriquecimento e atividade de bactérias anammox .....	161
Figura 5.30: Concentrações de cópias de DNA relacionadas ao RNAr 16S de bactérias anammox nos sistemas biológicos aos 120 dias destinados ao enriquecimento e após o período de 180 dias destinados à atividade de micro-organismos anammox .....	162

## LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS E ABREVIACÕES:

**ANAMMOX:** Anaerobic Ammonium Oxidation (reação de oxidação da amônia, sob condições anóxicas, tendo o nitrito como acceptor final de elétrons).

**BABE:** Bio-Augmentation Batch Enhanced

**BOA:** bactérias aeróbias oxidantes de amônia.

**BON:** bactérias aeróbias oxidantes de nitrito.

**CANON:** Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite (Remoção autotrófica de nitrogênio sob nitrito).

**Chorume:** lixiviado oriundo da decomposição de resíduos sólidos urbanos em aterros sanitários e/ou controlados.

**DEAMOX:** Denitrifying Ammonia Oxidation (Desnitrificação pela oxidação da amônia)

**DGGE:** eletroforese em gel por gradiente desnaturante.

**dNTP:** desoxirribonucleotídeos trifosfatos

**E<sub>0</sub>'**: é potencial redutor, tendência inerente (medida em volts) de um composto doar elétrons.

E<sub>0</sub>' corresponde ao potencial redutor em condições padrões.

**FISH:** hibridação *in situ* com sondas fluorescentes.

**HPLC:** High performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

**K<sub>s</sub>:** constante de afinidade pelo substrato

**N<sub>2</sub>:** gás nitrogênio

**N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>:** hidrazina

**N<sub>2</sub>O:** óxido nitroso.

**NH<sub>2</sub>OH:** hidroxilamina

**NH<sub>3</sub>:** amônia livre

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:** íon amônio

**NO:** óxido nítrico.

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** nitrato

**OD:** oxigênio dissolvido

**OLAND:** Oxygen-Limited Autotrophic Nitrogen Removal (Remoção autotrófica de nitrogênio com limitação de oxigênio).

**PCR:** reação polimerase em cadeia.

**PCRq:** reação polimerase em cadeia, quantitativa.

**PRIMER:** são sequências iniciadoras no processo de síntese e correspondem a curtas cadeias de nucleotídeos complementares à região inicial (*primer forward* - direto) e região final (*primer reverse* - reverso) da sequência alvo do DNA que se deseja amplificar.

**RBC:** Rotating biological contactors (discos biológicos rotativos).

**RBS:** Reator em bateladas sequenciais.

**SHARON:** Single reactor High activity Ammonium Removal Over Nitrite (Reator para alta atividade de remoção de amônia sob nitrito).

**SNAD:** Simultaneous partial Nitrification, Anammox and Denitrification process (Processo simultâneo de nitrificação parcial, anammox e desnitrificação).

**SNAP:** Single-stage Nitrogen removal using Anammox and Partial nitritation (Remoção de nitrogênio num único estágio usando anammox e nitritação parcial).

$V_{\max}$ : velocidade específica máxima de crescimento

$\Delta G^{\circ}$ : corresponde à energia livre em condições padrões.

**16S rDNA:** Ácido desoxirribonucleico, ou gene, que codifica o ácido ribonucleico ribossomal 16S encontrado na subunidade menor da região ribossômica 30S dos organismos procariotos.

**16S rRNA:** Ácido ribonucleico ribossomal 16S componente da subunidade menor da região ribossômica 30S dos organismos procariotos.



# 1 - INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um nutriente essencial para os seres vivos e deve estar presente nos ecossistemas em concentrações equilibradas com as necessidades biológicas dos organismos e, quando em excesso, nos ambientes aquáticos torna-se um problema ambiental.

O aporte do nitrogênio aos mananciais pode se dar em diferentes formas e estados de oxidação sendo as espécies mais comuns e, portanto, mais importantes devido ao seu potencial poluidor, o nitrogênio orgânico, o nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ), o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).

A amônia livre ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) é muito tóxica devido ser permeável pelas membranas celulares de peixes, pequenos vertebrados e invertebrados. A amônia pode ser acumulada nos tecidos desses animais levando a efeitos secundários como alterações do metabolismo, tais como a perda de equilíbrio, hiper-excitabilidade, aumento da atividade respiratória, aumento de batimentos cardíacos, bloqueio das funções vitais, danos ao fígado e rins, etc (Boardman *et al.*, 2004).

O nitrogênio, juntamente com o fósforo, pode estimular o florescimento das algas nos mananciais em que são lançados. Esse superflorescimento promove a eutrofização desses mananciais (Hasler e Swenson, 1967). Também, o nitrogênio na forma amoniacal apresenta demanda por oxigênio durante o processo de nitrificação para as formas oxidadas (nitrito e nitrato), dessa maneira contribui para redução do oxigênio dissolvido das águas (Metcalf e Eddy, 1991; Wang *et al.*, 2010).

Sob o ponto de vista de saúde pública, nitrato e nitrito podem ser responsáveis pelo desencadeamento de várias doenças. O nitrato, íon nitrogenado mais estável, é a principal forma dispersa em águas e consumida pelos humanos. No entanto, somente após o nitrato ser reduzido a nitrito, no interior do corpo humano, é que os problemas de saúde são iniciados. O nitrito na corrente sanguínea está relacionado com a oxidação da hemoglobina saudável (com  $\text{Fe}^{2+}$ ) para com  $\text{Fe}^{3+}$ , originando a metahemoglobina. O  $\text{Fe}^{3+}$  não permite o transporte de oxigênio, reduzindo assim, as trocas gasosas no organismo humano (WHO, 2011). O nitrito ainda pode se combinar com aminas secundárias, formando nitrosaminas com poder mutagênico e carcinogênico (Bitton, 2005; WHO, 2011).

O nitrogênio pode ser inserido nos mananciais por meio de despejos ilegais de águas residuárias não tratadas, ricas com as formas nitrogenadas, por lançamentos de águas residuárias tratadas com concentrações residuais de nitrogênio acima das recomendadas pela legislação (BRASIL, 2011) e, também, por entradas difusas por processos de carreamento superficial nas bacias hidrográficas (Hasler e Swenson, 1967; Porto, 1995).

Como exemplos de águas residuárias com grandes concentrações de nitrogênio pode-se citar os líquidos de fossas sépticas, chorumes de aterros sanitários, efluentes dos processos agroindustriais de frigoríficos, abatedouros e curtumes, efluentes de indústrias alimentícias e de fertilizantes e os efluentes formados a partir de dejetos animais, criados intensivamente, como suínos, bovinos e aves (van Hulle *et al.*, 2010).

A remoção de nitrogênio de águas residuárias é uma maneira efetiva para redução do seu aporte aos mananciais e, geralmente, a remoção é realizada em sistemas de tratamento baseados em processos físico-químicos e biológicos.

Os processos físico-químicos, dependendo das características da água residuária, removem eficientemente os compostos nitrogenados, no entanto, são dispendiosos. Os custos dos processos químicos estão associados aos produtos químicos usados na precipitação, oxidação, adsorção e *stripping* da amônia (Liang e Liu, 2007). Os processos térmicos necessitam de energia para elevação da temperatura à de evaporação. A utilização de processos de filtração, como a osmose reversa, depende de energia e das membranas que são geralmente caras e rapidamente desgastadas (IRAR, 2008; Liang e Liu, 2008).

A remoção biológica das formas nitrogenadas de águas residuárias é comumente realizada pelo processo convencional de nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica. Nos sistemas de lodos ativados, comumente utilizados, tem-se custos associados tais como gasto de energia para promover aeração no sistema, fontes externas de carbono inorgânico para manutenção da alcalinidade e de carbono orgânico para os organismos desnitrificantes heterotróficos.

Torna-se importante buscar e combinar processos biológicos que removam as diferentes formas nitrogenadas presentes nas águas residuárias e que reduzam os custos associados aos processos biológicos convencionais de nitrificação e desnitrificação e aos processos físico-químicos.

Dessa forma, o processo biológico, conhecido como anammox, realizado por bactérias capazes de oxidar anaerobicamente a amônia usando o nitrito como aceptor final de elétrons, apresenta-se com potencial promissor para a remoção de nitrogênio de águas residuárias em estações de tratamento, uma vez que não demanda as etapas de aeração e de introdução de fonte de carbono orgânico (Mulder, 1992; Strous *et al.*, 1998; Kuenen, 2008).

Desde a descoberta do processo anammox, no início dos anos 90, que estudos são realizados visando a sua aplicação em estações de tratamento de águas residuárias (Kuenen, 2008). No entanto, ainda que os estudos estejam se consolidando, permanecem desafios básicos para implementação do processo em escala plena. Entre eles, a definição dos limites quanto às concentrações dos substratos e oxigênio, diretrizes para controle e monitoramento do processo e fontes de inóculos para partidas dos sistemas (van der Star *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2010; Terada *et al.*, 2011; Kartal *et al.*, 2012; Jenni *et al.*, 2014).

Vale ressaltar que quase todos os projetos de tratamento, em escala plena, envolvendo remoção de nitrogênio de águas residuárias pelo processo anammox encontram-se localizados na Europa e Ásia. Conforme discutido por Sánchez *et al.* (2014), poucos estudos sobre a aplicação do processo anammox e a habilidade de inóculos em zonas tropicais têm sido desenvolvidos, e é particularmente importante que se mude esta estatística dada a diversidade dessa região. No Brasil, deve-se buscar fontes de inóculos e estudar as condições para o estabelecimento do processo anammox quando esse mecanismo de remoção de nitrogênio tornar-se uma alternativa de tratamento tecnicamente viável.

É, portanto, foco desse trabalho fornecer informações, resultantes de pesquisas experimentais, sobre fontes de inóculos para partida de sistemas anammox, enriquecimento de micro-organismos anammox em culturas em bateladas e ativação de biomassa para partida de sistemas em bateladas visando à remoção biológica de amônia pelo processo anammox.

Além do mais, a aplicação das técnicas de biologia molecular para o conhecimento das comunidades biológicas de reatores tratando águas residuárias tem auxiliado no entendimento dos vários processos biológicos permitindo a varredura de uma diversidade de habitats e o monitoramento dos sistemas ajustados para a atividade anammox (Jetten *et al.*, 2005; Sanz e Kochling, 2006; Bae *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2014).

Esse trabalho insere-se dentro da linha de pesquisa remoção biológica de nitrogênio de águas residuárias por meio de processos não convencionais articulada ao grupo de Pesquisa Aplicada à Engenharia Ambiental do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília. Vários aportes financeiros foram aplicados a essa pesquisa, os diretos como os recursos do Edital MCT/CNPq N° 014/2010 – Universal para aquisição de um reator tipo BioFlo 115, do Edital DPP/UnB 09/2011 para aquisição de reagentes para análises moleculares e os indiretos como dos projetos vinculados Águas - Pro Centro-Oeste/ 2010 financiado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia, por meio do FINEP, CNPQ, CAPES e FAPDF (processo 193.000.489/2011 FAP-DF) e do CAPES PRODOC/PNPD 02815/09-5) na aquisição de reagentes e suprimentos para as análises moleculares e iônicas.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - OBJETIVO GERAL**

Avaliar o desempenho de sistemas biológicos ajustados para enriquecimento e atividade dos micro-organismos responsáveis pelo processo anammox visando compreensão de características que favorecem a partida de reatores e o estabelecimento do processo anammox.

### **2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✦ Investigar diferentes fontes de inóculos provenientes de sistemas naturais e/ou de estações de tratamento de águas residuárias, caracterizando-os quimicamente e quanto à presença de bactérias quimiolitotróficas, sendo elas as oxidadoras anaeróbias de amônia e as nitrificantes.
- ✦ Definir condições físico químicas e operacionais para enriquecimento de biomassa com micro-organismos anammox para partida dos reatores visando à remoção de amônia pelo processo anammox.
- ✦ Avaliar alterações na composição das comunidades bacterianas ao longo do período de desenvolvimento e enriquecimento da biomassa por meio de técnicas de biologia molecular.
- ✦ Avaliar a utilização e conversão das formas nitrogenadas nos sistemas biológicos para avaliação dos processos metabólicos predominantes.
- ✦ Comparar os sistemas biológicos com os diferentes inóculos quanto à predominância do processo anammox para indicação de inóculos para uso em partidas de reatores visando a remoção de nitrogênio pelo processo anammox.

### 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 - PROCESSOS BIOLÓGICOS PARA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO

O processo de nitrificação para remoção de nitrogênio de águas residuárias começou a ser utilizado na primeira metade do século 20, com o objetivo de reduzir a demanda por oxigênio nos rios usados como corpos receptores e eliminar o efeito tóxico da amônia sobre as espécies aquáticas, conforme discutido por Henze *et al.* (2008). Dessa forma, os filtros biológicos foram os primeiros sistemas de tratamento para remoção de cargas orgânicas e de nitrogênio em cidades dos Estados Unidos, Europa e África do Sul. Posteriormente o processo de desnitrificação heterotrófica, para remoção de nitrito e nitrato, foi favorecido com suplementação dos sistemas com fontes de carbono orgânico pelo uso do metanol (Henze *et al.*, 2008).

Desde então a remoção biológica de nitrogênio por meio de uma etapa de nitrificação aeróbia e outra de desnitrificação anóxica ficou conhecida como processo convencional para remoção de nitrogênio de água residuárias. Atualmente, esse processo é combinado nos mais variados tipos de reatores (Alvarez-Vazques *et al.*, 2004; Ahn, 2006), como em reatores de leito fluidizado (Mulder *et al.*, 1995); gás-lift (Dapena-Mora *et al.*, 2004); bateladas sequenciais (Callado e Foresti, 2000; Ganigué *et al.*, 2007), entre outros (Chen *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006).

Geralmente, em estações de tratamento de águas residuárias, a primeira etapa para a remoção biológica do nitrogênio é o processo de nitrificação. Esse processo ocorre com a participação de dois grupos de bactérias quimiolitotróficas aeróbias, o primeiro grupo de bactérias oxida a amônia e a converte em nitrito e o segundo grupo de bactérias oxida o nitrito e o converte em nitrato (Mulder *et al.*, 1995; Sliemers *et al.*, 2005). Em sequência, o processo de desnitrificação é promovido pelas bactérias heterotróficas que usam o carbono orgânico como fonte de carbono e energia e os óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x^-$ ) como aceptores de elétrons.

Nos sistemas de tratamento é possível arranjar no posicionamento dos reatores de forma a permitir a ocorrência da pré-desnitrificação seguida da nitrificação. Nesse caso, é necessária a recirculação do efluente do reator de nitrificação para o de desnitrificação (Dapena-Mora

*et al.*, 2004). Há também a possibilidade dos processos de nitrificação/desnitrificação ocorrerem em um único reator, bastando haver alternância de períodos e/ou zonas óxicas e anóxicas (Mulder *et al.*, 1995).

As condições necessárias para que a nitrificação e a desnitrificação ocorram eficientemente são oferta de oxigênio para permitir a nitrificação por bactérias quimiolitotróficas aeróbias e fonte de carbono orgânico para as bactérias heterotróficas anaeróbias facultativas responsáveis pelo processo de desnitrificação. É ainda necessário que se garanta a alcalinidade do meio para que a nitrificação ocorra com bom desempenho (Ganigué *et al.*, 2007).

No processo convencional de nitrificação autotrófica e desnitrificação heterotrófica, os gastos com energia para aeração e com fonte externa de carbono são estimados em 2,8 kWh. N kg<sup>-1</sup> e 3 kg metanol. N kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Nesse processo tem-se ainda como inconveniente a grande produção de lodo, em torno de 1 SSV kg. N kg<sup>-1</sup> (Suneethi e Joseph, 2011).

A busca por processos biológicos e/ou arranjos de sistemas de tratamento que reduzam os custos e que apresentem boa eficiência na remoção das cargas nitrogenadas é cada vez mais intensa. Várias das novas propostas tecnológicas de remoção de nitrogênio já se encontram patenteadas (Li *et al.*, 2008; Bagchi *et al.*, 2012). Alguns desses novos processos biológicos e arranjos para remoção de nitrogênio das águas residuárias são discutidos a seguir, de acordo com revisões publicadas por Schmidt *et al.* (2003), Ahn (2006) e Bagchi *et al.* (2012).

O processo de nitrificação parcial é a oxidação da amônia até nitrito, inibindo-se a oxidação subsequente do mesmo (Figura 3.1). Há vários mecanismos para inibir a oxidação do nitrito a nitrato. Entre eles tem-se o uso da diferença de energia de ativação para oxidação da amônia e do nitrito (68 kJ mol<sup>-1</sup> e 44 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente). A maior energia de ativação necessária para a oxidação da amônia torna esse processo mais dependente da temperatura. Em outro mecanismo, opera-se com menor concentração de oxigênio em meio com excesso de amônia. Também, pode-se usar de concentrações inibitórias de amônia livre e óxido nitroso para as bactérias oxidadoras de nitrito (Anthoniesen *et al.*, 1976). Todos esses mecanismos dificultam o crescimento dos organismos oxidadores de nitrito e tendem a favorecer os oxidadores de amônia.

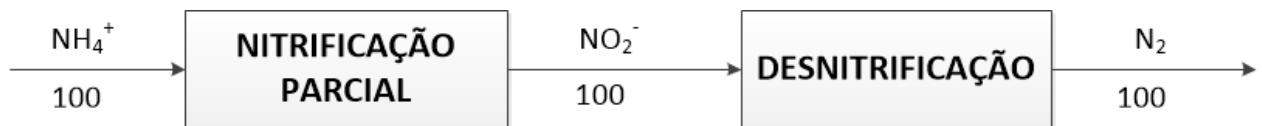


Figura 3.1: Fluxograma mostrando o processo de nitrificação parcial seguido por desnitrificação. Os números representam as concentrações idealizadas das formas nitrogenadas em percentuais.

O sistema SHARON (*Single reactor High activity Ammonium Removal Over Nitrite*), faz uso da diferença entre as taxas de crescimento dos organismos oxidadores de amônia e nitrito em temperaturas em torno de 35°C (Hellinga *et al.*, 1998). Nas informações constantes em registros de patentes para aplicação desse processo, a água residuária deve ser tratada em tanques com agitação contínua sem retenção do lodo e com tempo máximo de detenção hidráulica de 1,5 dias (Dijkman e Strous, 1999). Portanto, os principais parâmetros operacionais são os tempos de detenção hidráulica e de retenção do lodo que devem ser inferiores às taxas de crescimento dos micro-organismos oxidadores de nitrito (Hellinga *et al.*, 1998). Ainda, citam-se o pH do licor entre 7,5 a 8,0, concentrações de oxigênio dissolvido e de substratos como parâmetros importantes (Li *et al.*, 2008; Bagchi *et al.*, 2012)

Em outro registro de patente, com base no processo SHARON, observa-se a razão de 1 entre amônia e bicarbonato para manter a estabilidade do pH do licor e garantir a oxidação de 50% da amônia presente na água residuária por nitrificação em um reator específico a essa finalidade (van Loosdrescht e Jetten, 1997) (Figura 3.2).

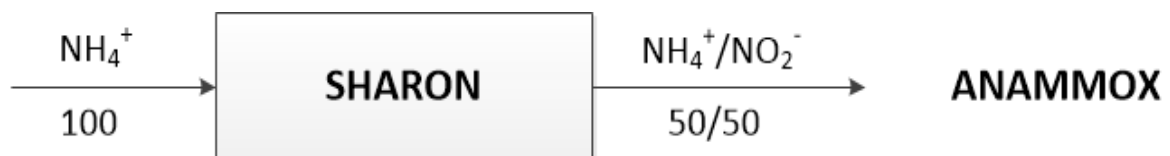


Figura 3.2: Fluxograma mostrando a conversão desejada de amônia por meio do processo SHARON. Os números representam as concentrações idealizadas das formas nitrogenadas em percentuais.

Jetten *et al.* (1999) sugeriram a combinação dos processos SHARON e ANAMMOX (*Anaerobic Oxidation of Ammonium*), em reatores separados, para tratamento de águas



residuárias ricas em amônia. Essa combinação é ideal para remover nitrogênio de efluentes com concentrações altas de amônia ( $> 0,5 \text{ gN.L}^{-1}$ ).

Em situações onde há limitação de oxigênio o processo de nitrificação é desfavorecido, podendo ocorrer apenas a conversão parcial da amônia para nitrito devido a inibições da biomassa presente. No entanto, tem-se utilizado da limitação permanente de oxigênio, em determinadas estações de tratamento de águas residuárias para conseguir limitar a conversão do nitrito para nitrato. Buscam-se com isso os processos conhecidos como completa remoção autotrófica de nitrogênio sob nitrito (CANON) e remoção autotrófica de nitrogênio com limitação de oxigênio (OLAND) (Kuai e Verstraete, 1998; Sliemers *et al.*, 2005).

O sistema CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*) pode ser definido como a combinação do processo de nitrificação parcial e do processo anaeróbio de oxidação da amônia (anammox) em um único reator aerado (Figura 3.3). Refere-se também à cooperação entre dois grupos de bactérias: as oxidadoras aeróbias de amônia consomem o oxigênio e criam condições anóxicas para que as bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia atuem (Sliemers *et al.*, 2002). Os parâmetros operacionais, oxigênio dissolvido, carga de nitrogênio aplicável, espessura do biofilme e temperatura devem ser bem ajustados (Ahn, 2006; Bagchi *et al.*, 2012). Um arranjo do sistema para combinação desses dois processos biológicos foi patenteado por Dijkman e Strous (1999), ajustando condições para desenvolvimento de grânulos que permite a convivência simbiótica entre bactérias aeróbias e anaeróbias oxidadoras de amônia.



Figura 3.3: Fluxograma mostrando que no processo CANON, em um único reator, a amônia pode ser convertida principalmente em nitrogênio gasoso e nitrato. Os números representam as concentrações idealizadas das formas nitrogenadas em percentuais.

O processo conhecido como  $\text{NO}_x$  ocorre quando se controla e estimula a atividade de desnitrificação por organismos como *Nitrosomonas*, adicionando-se óxidos de nitrogênio em forma gasosa (Figura 3.4). Nesse processo tem-se demandas menores por oxigênio

dissolvido (50%) pois o nitrito é usado como aceptor de elétrons, e por carbono orgânico (80%), quando comparado ao processo convencional de nitrificação e desnitrificação. A quantidade de  $\text{NO}_x$  introduzida é somente em concentrações traços servindo como indutores do processo.

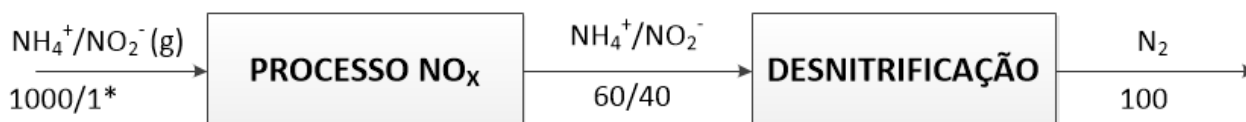


Figura 3.4: Fluxograma mostrando que o processo  $\text{NO}_x$  é ativado pela presença de pequenas concentrações de óxidos de nitrogênio. Os números representam as concentrações idealizadas das formas nitrogenadas em percentuais. (g = gasoso).

O sistema OLAND (*Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification and Denitrification*) é uma variante do sistema CANON e nesse sistema a remoção de amônia pode ocorrer em um ou dois estágios, sem adição de fonte externa de carbono e em concentrações de oxigênio dissolvido inferiores a  $0,2 \text{ mg OD.L}^{-1}$  (Ahn, 2006). Esse sistema possui semelhanças operacionais com o CANON e  $\text{NO}_x$  (Schmidt *et al.*, 2003). Adota-se os discos biológicos rotativos para o desenvolvimento do sistema OLAND em um estágio e os biorreatores de membranas para OLAND em dois estágios. As etapas de nitrificação e desnitrificação são conduzidas principalmente pelas bactérias aeróbias e anaeróbias oxidadoras de amônia (Kuai e Verstraete, 1998; Bagchi *et al.*, 2012). A vantagem desse sistema é manter-se estável em condições de temperatura oscilando entre 22 e 30 °C (Li *et al.*, 2008).

Objetivando a remoção de todas as formas nitrogenadas e da matéria orgânica carbonácea em águas residuárias, desenvolveu-se um sistema utilizando o processo de oxidação anaeróbia da amônia (ANAMMOX) no retorno do efluente para um tanque de desnitrificação, tendo sido patenteado o arranjo de três reatores, onde um distribuidor encaminha uma parte do fluxo para o reator de nitrificação e outra parte para o reator de desnitrificação e os fluxos efluentes desses dois reatores são destinados para o reator ANAMMOX com posterior retorno do efluente desse para o reator de desnitrificação (Figura 3.5) (Isaka e Sumino, 2007).

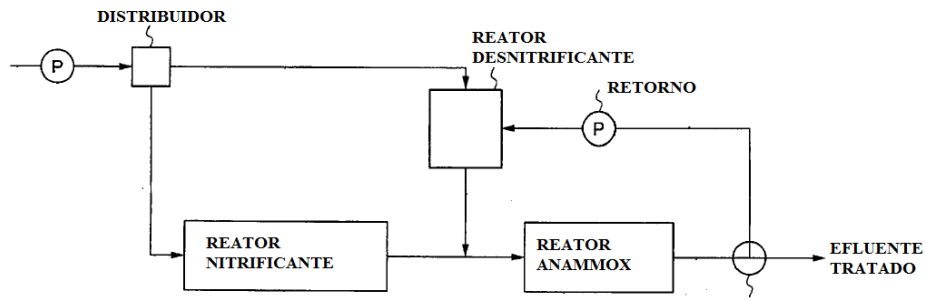


Figura 3.5: Fluxograma do sistema patenteado (US007267764B2) para remoção das formas nitrogenadas e carbonáceas de águas residuária. Adaptado de Isaka e Sumino (2007)

No entanto, de maneira a otimizar sistemas para redução de custos no tratamento de águas residuárias com altas cargas de nitrogênio, alguns autores sugeriram ainda a simultaneidade de vários processos em um único reator, sistema conhecido como SNAD. Chen *et al.* (2009) conseguiram boa eficiência de remoção de nitrogênio e carbono orgânico operando discos biológicos rotativos (RBC) em escala experimental.

O sistema SNAD (*Simultaneous partial Nitrification, Anaerobic Ammonium oxidation and Denitrification*) é conduzido pela coexistência de bactérias nitrificantes, anammox e bactérias desnitrificantes heterotróficas em um mesmo reator. As grandes vantagens desse sistema são remoção de todas as formas de nitrogênio presentes numa água residuária e também reduzir o carbono orgânico necessário à desnitrificação clássica (Wang *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2011). Os grânulos que se desenvolvem em sistemas SNAD apresentam-se com diâmetro de 5mm e coloração vermelha, indicativa da atividade anammox (Figura 3.6).



Figura 3.6: A) Grânulos da biomassa com as bactérias aeróbias oxidantes de amônia, as anaeróbias oxidantes de amônia e as desnitrificantes. B) Grânulos com diâmetro médio de 5mm (Wang *et al.*, 2010).

Ocorrem, ainda, duas variantes de processos para remoção de nitrogênio combinando-se a nitrificação, a oxidação anaeróbia da amônia e/ou desnitrificação autotrófica, sendo eles o DEAMOX (*DEnitrifying AMmonium OXidation*) e BABE (*Bio-Augmentation Batch Enhanced*) (Bagchi *et al.*, 2012). No DEAMOX não é requerida a etapa da nitrificação parcial, pois é introduzida a redução do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito usando o sulfeto como doador de elétrons conforme equação 3.1. Esse processo é recomendado para o tratamento de águas residuárias com concentrações de nitrogênio e de sulfetos, como exemplo os efluentes dos processos industriais de produção de fermentos (Kalyuzhnyi e Gladchenko, 2009). Esse processo tecnológico é proposto num arranjo de três reatores (Figura 3.7).

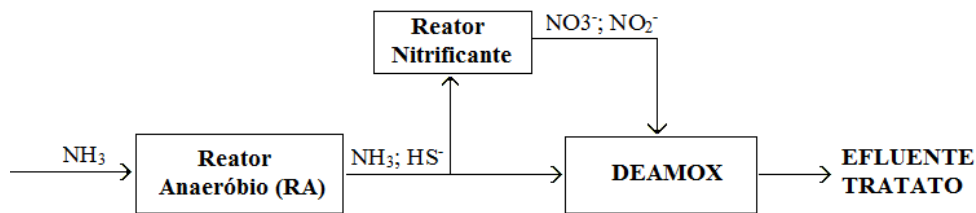
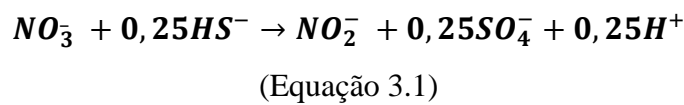


Figura 3.7: Fluxograma mostrando o processo DEAMOX.  
Adaptado de Bagchi *et al.* (2012).

No arranjo tecnológico proposto, um afluente rico em amônia ( $\text{NH}_4$ ) e enxofre (S orgânico) é usado para alimentar um reator anaeróbio que, após o tempo necessário de detenção hidráulica, converte o enxofre orgânico em sulfetos. O efluente do reator anaeróbio é dividido para duas linhas que alimentam cada qual um reator nitrificante convencional responsável pela conversão da amônia em nitrito e nitrato e o reator DEAMOX. Nesse último reator, que também recebe o efluente do reator nitrificante, tem-se a combinação dos substratos necessários ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_2^-$ ) à reação anammox (Kalyuzhnyi e Gladchenko, 2009).

O processo BABE baseia-se na utilização de um reator, na linha de recirculação do lodo, no qual se promove o desenvolvimento dos micro-organismos nitritantes (bio-amplificação) e concomitantemente a acumulação de nitrito que retorna para o reator anaeróbio e garante a razão estequiométrica necessária para o processo de oxidação anaeróbia da amônia (Figura 3.8).

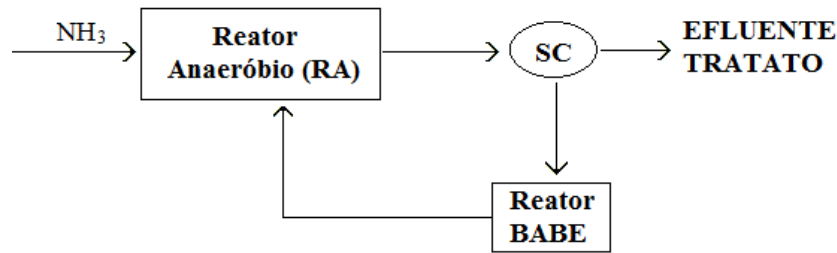


Figura 3.8: Fluxograma mostrando o processo BABE.  
Adaptado de Bagchi *et al.* (2012).

Como apresentado anteriormente, vários sistemas como SHARON, CANON, OLAND, SNAD, DEAMOX e BABE são projetados para permitir o desenvolvimento de um grupo de micro-organismos capazes de oxidar a amônia tendo o nitrito como acceptor de elétrons.

Portanto, no processo ANAMMOX (*Anaerobic Oxidation of Ammonium*), ocorre a oxidação da amônia para gás nitrogênio usando o nitrito como acceptor de elétrons (Figura 3.9). Para cada mol de amônia a ser convertida é necessário 1,32 mol de nitrito (Strous *et al.*, 1998) e, por isso, as concentrações de amônia e nitrito no afluente devem ter relação de 1:1 (Ahn, 2006). Essa rota metabólica havia sido considerada termodinamicamente possível por Broda em 1977. No entanto, a primeira descrição da ocorrência da oxidação anaeróbia da amônia em sistemas de tratamento de águas residuárias foi realizada por Mulder *et al.* (1995).

Os micro-organismos responsáveis por esse processo metabólico pertencem ao grupo dos Planctomycetes (Strous *et al.*, 1998; Strous *et al.*, 1999). Com essa descoberta obteve-se uma melhor compreensão do ciclo do nitrogênio (Vlaeminck *et al.*, 2011), apresentando mais um mecanismo da oxidação da amônia e conseqüente remoção de nitrogênio de águas residuárias.



Figura 3.9: Fluxograma mostrando que numa relação molar aproximada de 1:1 entre amônia e nitrito por meio do processo ANAMMOX é possível a oxidação anaeróbia da amônia. Os números representam as concentrações idealizadas das formas nitrogenadas em percentuais.

Vislumbrando a utilização da rota metabólica anammox no tratamento de águas residuárias, foi patenteada a aplicação do processo de desnitrificação autotrófica combinada com o íon amônio, tendo-se como vantagens a redução do oxigênio e carbono orgânico aplicados no sistema (Mulder, 1992).

No primeiro registro de patente utilizando-se o processo ANAMMOX para remoção de amônia de águas residuárias julgava-se que o íon oxidante fosse preferencialmente o nitrato (Mulder, 1992). Posteriormente, ficou comprovado que o processo anammox ocorria preferencialmente com o nitrito como acceptor de elétrons (Strous *et al.*, 1998).

A principal limitação para utilização efetiva do processo ANAMMOX em sistemas de tratamento para remoção de nitrogênio é o tempo requerido para a partida dos reatores, ainda que todas as condições estejam ajustadas ao desenvolvimento dos micro-organismos responsáveis pelo processo. Esse tempo de partida está associado às taxas lentas de crescimento das bactérias anammox (Strous *et al.*, 1998) e, por isso, exigindo sistemas com eficiente retenção celular (Schmid *et al.*, 2005). As configurações de reatores como os de lodos ativados (Mulder, 1992), leito fixo (Mulder, 1992; Strous *et al.*, 1997), leito fluidizado (Mulder, 1992; van de Graaf *et al.*, 1996), bateladas sequenciais (Strous *et al.*, 1998; Dapena-Mora *et al.*, 2004; Ganigué *et al.*, 2007; Kartal *et al.*, 2011), reatores de gás-*lift* (Dapena-Mora *et al.*, 2004), discos rotativos (van de Graaf *et al.*, 1996; Egli *et al.*, 2003; Windey *et al.*, 2005) foram utilizados com sucesso para desenvolvimento dos micro-organismos anammox.

Os desafios para aplicação desse processo em sistemas plenos são justamente a estratégia de partida de reatores visando reduzir o tempo de emergência da atividade e a estabilização da eficiência do processo anammox (Terada *et al.*, 2011). A eficiência na remoção de nitrogênio pelo processo anammox depende do enriquecimento das bactérias, as quais requerem um período entre 180 a 280 dias nos reatores para representarem entre 70 a 80% da comunidade microbiana (Kartal *et al.*, 2012).

Vale ressaltar que quase todos os projetos de tratamento, em escala plena, envolvendo remoção de nitrogênio de águas residuárias pelo processo anammox encontram-se localizados na Europa, Ásia e, recentemente nos Estados Unidos (Munõz *et al.*, 2007; Bagchi *et al.*, 2012; Lackner *et al.*, 2014). No Brasil, devem-se buscar fontes de inóculos a serem adotados para quando esse processo se tornar uma alternativa de tratamento tecnicamente viável. Além do mais, as temperaturas mesófilas, ocorrentes durante quase todo o ano no

Brasil, favorecem a aplicação dessa tecnologia em escala plena (Aiyuk *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2014).

Os trabalhos já realizados no Brasil testaram inóculos para partidas de reatores anammox oriundos de lagoa de estabilização tratando efluente de abatedouro de frangos e suínos (Reginatto *et al.*, 2005), de sistemas de lodos ativados tratando esgotos domésticos (Reginatto *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2010), de sistemas de tratamento de dejetos suínos (Kunz, 2007; Schierholt Neto, 2007), de reatores nitrificantes/desnitrificantes tratando efluentes de indústria produtora de aminoácidos e UASB tratando efluente de abatedouro de aves (Martins, 2007), de lagoas de polimento, *wetlands* plantados e não plantados e de reator UASB tratando esgotos domésticos (Costa, 2013a), de diversas partes do sistema de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo, composto por lagoas aeradas, discos rotativos e lagoa de estabilização (Costa, 2013a). Em todos esses estudos, somente após 200 dias de operação dos reatores, é que foram atingidas eficiências significativas de remoção de nitrogênio pelo processo anammox, mas em sistemas operados com baixas cargas de nitrogênio aplicadas.

A partir desses estudos, confirma-se a ubiquidade dos micro-organismos anammox (Kartal *et al.*, 2012; Bagchi *et al.*, 2012), no entanto, o tempo gasto requerido para efetivação do processo anammox demonstra a necessidade de continuar a busca por inóculos e condições que acelerem a partidas dos sistemas visando a remoção anaeróbia das formas nitrogenadas.

Existem vantagens econômicas e ambientais significativas para adoção do processo anammox como forma de tratamento de águas residuárias para remoção de nitrogênio, sendo elas: redução de 90% dos custos operacionais devido à redução da aeração e aporte de carbono orgânico nos sistemas e menor área requerida para instalação de reatores anammox (Vives *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2011). Tem-se, ainda, menor produção de lodos devido à baixa velocidade de duplicação das bactérias anammox (Kim *et al.*, 2006; Jetten *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Além do mais, a vantagem ambiental da diminuição, em média, de 90% das emissões de gases relacionados ao efeito estufa, pois, o processo não emite N<sub>2</sub>O e ainda consome o CO<sub>2</sub> (Abma *et al.*, 2010; Kartal *et al.*, 2012).

No estudo de Munoz *et al.* (2007) é apresentada a estimativa de custo para remoção do nitrogênio amoniacal de águas residuárias por diferentes sistemas (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Custo estimado (R\$/kg N) para remoção de nitrogênio amoniacal de águas residuárias por meio de diferentes processos.

<b>Processo</b>	<b>Custo estimado (R\$ / kg N)</b>
Sharon <sup>1</sup>	5,27 <sup>3</sup>
Anammox <sup>2</sup>	2,44 a 3,86 <sup>4</sup>
Sharon-Anammox	3,89 a 4,64 <sup>5</sup>
Nitrificação/Desnitrificação convencionais	8,08 a 15,80 <sup>6</sup>
Tratamentos físico-químicos	15,80 a 39,68 <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Single reactor High activity Ammonium Removal Over Nitrite; <sup>2</sup>Reação de oxidação da amônia, sob condições anóxicas, tendo o nitrito como acceptor de elétrons; <sup>3</sup>Fonte: Fundação Stowa (2001). Estimativa dos custos para uma unidade de ETE com capacidade de tratamento de 500.000 habitantes. <sup>4</sup>Fonte: Centro avançado de tratamento de águas residuárias da Universidade de Queensland na Austrália (2005). <sup>5</sup>Fonte: Grontmij Nederland (2004); <sup>6</sup>Fonte: Fundação Stowa (2001) **adaptado de Munõz *et al.*, 2007**. A conversão de moedas foi realizada de acordo com a cotação do Banco Central do Brasil em 30/06/2015: 1 EURO/EUR (978) = 3,5080 REAL BRASIL/BRL (790).

Em recente publicação, levantaram-se pelo menos 100 estações de tratamento, em escala plena, utilizando da combinação de nitrificação parcial e anammox para a remoção de amônia de águas residuárias, confirmando-se o processo anammox como solução biotecnológica para remoção de nitrogênio (Lackner *et al.*, 2014).

Ressalta que entre essas estações de tratamento, destacam-se os sistemas com reatores em bateladas sequenciais (RBS) como a tecnologia mais empregada, em mais de 50% dos casos. Entre todas as instalações configuram-se os sistemas de um estágio (88%) e tratando especialmente esgotos urbanos (75%) (Lackner *et al.*, 2014).

### **3.2 - INÓCULOS PARA PROCESSO ANAMMOX**

Desde a descoberta da atividade anammox em reatores de nitrificação/desnitrificação em uma estação de tratamento de águas residuárias na Holanda por Mulder *et al.* (1995), vários estudos foram desenvolvidos buscando o conhecimento dos micro-organismos envolvidos, os aspectos operacionais dos reatores para favorecer a atividade anammox, entre outros. De acordo com alguns estudos, que revisaram a maioria das publicações científicas sobre esse processo, indicam os desafios para área, sendo principalmente a estratégia de partida de



reatores visando reduzir o tempo de emergência da atividade, estabilização e eficiência do processo anammox (Terada *et al.*, 2011; Bagchi *et al.*, 2012, Jenni *et al.*, 2014).

A composição do inóculo parece ser determinante no tempo de partida de reatores com atividade anammox e está relacionada com a origem do inóculo (Terada *et al.*, 2011). Tsushima *et al.* (2007b) demonstraram que a abundância de organismos anammox e a relação carbono e nitrogênio ( $C/N_{total}$ ) do inóculo influenciam no tempo de estabelecimento da atividade anammox e na taxa de remoção de nitrogênio. Assim, quanto maior o número de cópias de genes relacionados a micro-organismos anammox, comprovando a maior abundância desses organismos e menor valor na relação  $C/N_{total}$ , mais rapidamente consegue-se a partida de reatores visando a atividade anammox.

Diferentes inóculos foram testados buscando-se avaliar o tempo de partida de reatores visando a atividade anammox pelas bactérias autotróficas do grupo Planctomycetes. Vives *et al.* (2007) utilizaram uma mistura de biomassas oriundas de sistemas de lodos ativados, de estação de tratamento de chorume e de esgoto municipal e registraram estabilidade do processo anammox somente após 225 dias. Em outro estudo foi utilizado lodo proveniente de um sistema convencional de lodos ativados que trata esgoto doméstico da cidade de Belo Horizonte (MG), para enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia, e verificou-se o aumento na abundância de tais micro-organismos anammox com a consequente atividade anammox após 125 dias (Araújo *et al.*, 2010).

Chamchoi e Nitorisavut (2007) testaram inóculos a partir de lodos de UASB, lodos ativados e lodo de digestão anaeróbia em reatores em bateladas sequenciais (RBS) para enriquecimento de micro-organismos anammox. Após 4 meses de operação registraram atividade anammox com eficiência na remoção de amônia em torno de 80% para todos os inóculos testados quando afluente cerca de  $90 \text{ mg.L}^{-1}$  nitrogênio total. No entanto, o RBS inoculado com lodo de UASB apresentou uma menor população anammox, quando comparado aos outros reatores inoculados com os demais lodos.

Também, foram testados inóculos a partir de biomassas oriundas de estações de tratamento com altas cargas de nitrogênio. Martins (2007) utilizou biomassa de reator nitrificante / desnitrificante de uma estação de tratamento de água residuária de indústria produtora de aminoácidos e de lodo granular de reator UASB de abatedouro de aves, ambos localizados no Brasil. No entanto, as condições de operação dessas estações não favoreciam os micro-

organismos anammox.

Nos estudos visando a remoção de nitrogênio pelo processo anammox, a biomassa passa por estágios durante a partida dos reatores, até que apresente eficiência na remoção da amônia. Esses estágios são conhecidos como crescimento e enriquecimento (Tao *et al.*, 2013). Ao longo da partida dos reatores diferentes parâmetros operacionais devem ser adotados a fim de que não ocorram inibições devido às concentrações das diferentes formas de nitrogênio e de outras substâncias.

Em várias pesquisas, usando diferentes inóculos, foram obtidos resultados diferenciados no tempo de partida e na estabilização do processo anammox. Na maioria dos estudos, o início da detecção de atividade anammox só foi registrado a partir de 60 dias da inoculação nos sistemas.

Os estágios de partida dos reatores, crescimento e enriquecimento, são geralmente longos. Vives *et al.* (2007) detectaram atividade anammox em um reator de batelada sequencial a partir do sexagésimo dia do início da operação do reator e gastaram mais 145 dias no estágio de enriquecimento. Araújo *et al.* (2007) relataram que em um RBS, utilizando-se inóculo proveniente de sistemas de lodos ativados, foram necessários 25 dias para cessar a atividade desnitrificante por bactérias heterotróficas e mais 62 dias para a etapa de enriquecimento.

Martins (2007), operando quimiostatos, registrou que após cerca de 136 dias as concentrações dos parâmetros analisados amônia, nitrito e nitrato apresentaram padrões que demonstravam início da estabilização do processo anammox. Mas somente a partir de 272 dias de operação foi que o pesquisador observou eficiências em torno de 70% na remoção de amônia e nitrito.

O modo de crescimento da biomassa, se suspensa ou imobilizada, pode contribuir para acelerar a partida de reatores. Chamchoi e Nitorisavut (2007) desenvolveram seus experimentos com biomassa suspensa em reatores de bateladas sequenciais e conseguiram, após quatro meses, obter eficiência na remoção de amônia acima de 70%. Van de Graaf *et al.* (1996), trabalhando com um reator de leito imobilizado, obtiveram remoção de amônia acima de 70% somente após sete meses de operação. Em sistemas com biomassa suspensa ocorre uma melhor distribuição do substrato e conseqüentemente redução no tempo de partida.

A utilização de biomassa já enriquecida com micro-organismos do grupo Planctomycetes não é garantia para a rápida partida de sistemas anammox. Dapena-Mora *et al.* (2004) realizaram experimentos para avaliação da atividade anammox usando biomassa já enriquecida, oriunda de um RBS em escala de bancada, e conseguiram remover amônia e nitrito partir da montagem do sistema. No entanto, quando se utilizou biomassa oriunda do reator que se detectou pela primeira vez a atividade anammox, na Holanda, ou seja, com micro-organismos aclimatados, demorou-se mais de 90 dias para se obter eficiência na remoção de amônia (Jetten *et al.*, 1999).

Tsushima *et al.* (2007a) estudaram o sucesso de enriquecimento de culturas anammox em sistema de semi-bateladas. Água residuária sintética, com os substratos amônia e nitrito, foi usada para alimentar as culturas. O sucesso no enriquecimento e remoção dos compostos nitrogenados só foram obtidos após o 340º dia. Depois desse período de aclimação, foi determinado o tempo de duplicação para essas culturas como sendo de 4,3 dias. A biomassa utilizada nas culturas foi oriunda de discos rotativos submersos, em escala de bancada, operados para avaliar o efeito da relação C/N na distribuição espacial de micro-organismos nitrificantes e heterotróficos no biofilme (Okabe *et al.*, 1995).

Estudos realizados para avaliar a remoção de nitrogênio de águas residuárias ou de meios sintéticos por processo anammox e que obtiveram eficiências de remoção superiores a 95% do nitrogênio total usaram biomassa aclimatada às condições ótimas para as bactérias anammox por mais de 3 anos (Jetten *et al.*, 1999, Dapena-Mora *et al.*, 2004).

Em um estudo, usando inóculos a partir de lagoa aerada tratando efluente de refinaria de petróleo e de *wetland* construído tratando esgoto doméstico em biofiltros anaeróbios, em escala de bancada, foi possível atingir eficiências acima de 98% para remoção de nitrogênio pelo processo anammox após 300 dias, com cargas aplicadas de 0,550 e 0,350 kg N.m<sup>-3</sup>dia<sup>-1</sup> de amônia e nitrito, respectivamente (Costa, 2013a; Costa *et al.*, 2014).

A detecção de micro-organismos e atividade anammox em amostras de ambientes naturais combinada com as informações das condições ambientais pode facilitar a procura por outras fontes de biomassa para serem usadas como inóculos em reatores em escala de bancada, piloto e plena (Schmid *et al.*, 2005). As interfaces óxicas/anóxicas de muitos sedimentos naturais e ambientes antropizados mostram-se como habitats ideais para os micro-organismos oxidadores anaeróbios de amônia (Jetten *et al.*, 1999).

Costa (2013a) registrou a presença de micro-organismos anammox, por análise de biologia molecular, em 23 amostras de lodos extraídos em sistemas de tratamento de esgotos, tais como lagoas de polimento, reatores UASB, *wetlands* construídos plantados (*Typha latifolia*) e não plantados e, ainda, em sistemas de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo composto por lagoa aerada, biodiscos e lagoas de polimento localizados no Brasil.

Dessa forma, utilizar biomassas oriundas de ecossistemas naturais ou artificiais, onde ocorre a presença de altas concentrações de nitrogênio amoniacal e onde os fatores ambientais favoreçam o desenvolvimento de micro-organismos anammox pode reduzir o período de tempo gasto na partida de reatores visando a atividade anammox. Tsushima *et al.* (2007b) demonstram que quanto menor a relação carbono/nitrogênio nos inóculos melhor é a resposta de enriquecimento e atividade anammox. Da mesma maneira, concentrações de amônia e nitrito e a ausência de oxigênio são condições para a ocorrência do processo de oxidação anaeróbia da amônia pelo mecanismo anammox (Jetten *et al.*, 1999). Alguns outros aspectos ambientais, tais como alto potencial redox e baixas concentrações de sulfetos são importantes em inóculos para o desenvolvimento dos organismos anammox (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009).

Sánchez-Melsió *et al.* (2009) demonstraram que bactérias como “*Candidatus Brocadia anammoxidans*” foram detectadas em várias culturas para enriquecimento anammox cujos inóculos foram coletados em diversos ambientes com condições variando nas concentrações de nitrito, amônia, salinidade, sulfeto de hidrogênio, entre outros fatores.

Conforme indicado, os micro-organismos anammox são espécies ubíquas (Bagchi, *et al.* 2012; Kartal *et al.*, 2012) e, dessa forma, os ambientes naturais como os mangues nas regiões costeiras brasileiras e as veredas do cerrado reúnem condições que podem abrigar os organismos anammox. Também, sistemas de tratamento de efluentes de frigoríficos/abatedouros e lagoas de chorume, devido às características dessas águas residuárias, podem oferecer boas condições para o desenvolvimento dos organismos anammox. Nas regiões tropicais, sedimentos de lagos e lagoas que recebem contribuições de nutrientes por carreamento das bacias hidrográficas podem também servir de *habitats* para o desenvolvimento de micro-organismos anammox.

Em mangues, as atividades microbiológicas são processos chaves para a alta produtividade desses ecossistemas (Li *et al.*, 2010). Espécies de arqueias e bactérias foram descritas em

mangues e identificadas como as principais no processo de oxidação de amônia nesses ambientes. Foram investigadas a diversidade filogenética, a distribuição e abundância de arqueias e bactérias oxidadoras de amônia, relacionando com a presença de árvores de mangue e com a profundidade no sedimento. A concentração de amônia ( $\text{NH}_4$ ) foi o fator principal na distribuição das arqueias oxidadoras de amônia, enquanto a distância da vegetação do mangue e a salinidade foram os fatores mais importantes para a distribuição das bactérias oxidadoras de amônia. Também, a coexistência de bactérias anammox apresentou correlação positiva com as arqueias oxidadoras de amônia (Li *et al.*, 2010).

Foi investigada a resposta de sedimentos e lodos de diferentes origens ao enriquecimento das bactérias anammox em sistemas de culturas em bateladas. Sánchez-Melsió *et al.* (2009) avaliaram a atividade e os organismos anammox presentes em culturas em bateladas oriundas de 13 diferentes inóculos testados: sedimentos a partir de ambientes lacustres, lagoas salobras, ambientes costeiros, *wetlands* construídos e lodos de digestores anaeróbios (3 inóculos) e de SBR anóxicos (6 inóculos). Pela análise da relação estequiométrica anammox, somente 6 culturas, provenientes de dois inóculos de SBR anóxicos, de lagoa salobra, de *wetland* construído e de dois inóculos de digestores anaeróbios, apresentaram respostas em termos de atividade anammox.

Schierholt Neto (2007) testaram dois inóculos provenientes de sistemas de tratamento de dejetos de suínos em reatores tubulares com meio suporte, em escala de bancada, para atividade anammox. A seleção desses inóculos baseou-se no fato que biomassa adaptada a tratamento de efluentes com altas cargas de nitrogênio, como é o caso dos dejetos suínos (faixa de 2150 a 8100 mg NTK.L<sup>-1</sup> e 1420 a 3400 mg NH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>), pudessem apresentar uma diversidade de micro-organismos anammox e assim desenvolver-se em sistemas visando a atividade anammox.

A origem dos inóculos utilizados por Schierholt Neto (2007) foi o lodo biológico de uma lagoa experimental desativada onde se desenvolvia um sistema de aeração intermitente e o lodo de um decantador secundário de uma estação de tratamento de dejetos de suínos localizadas no Brasil. Esses inóculos passaram por uma etapa de aclimação (63 dias) de forma a lavar e eliminar o máximo possível de microrganismos competidores ou substâncias que pudessem prejudicar o desenvolvimento dos micro-organismos anammox.

Schierholt Neto (2007) avaliaram a atividade anammox por meio dos coeficientes

estequiométricos globais encontrados a partir da avaliação dos produtos efluentes dos reatores testados. Esses autores encontraram razões estequiométricas muito próximas às citadas na literatura para a atividade anammox (1 mol  $\text{NH}_4^+$  e 1,31 mol  $\text{NO}_2^-$  consumidos para 1,05 mol de  $\text{N}_2$  e 0,22 mol  $\text{NO}_3^-$  produzidos) (Strous *et al.* 1998). A confirmação dos micro-organismos anammox ocorreu com os resultados obtidos por análises de biologia molecular. Ainda, o reator inoculado com lodo proveniente da lagoa desativada apresentou melhor desenvolvimento para a atividade anammox removendo maiores cargas de nitrogênio [em torno de 290 mg N.L dia<sup>-1</sup>].

Para o desenvolvimento dos organismos anammox deve-se observar as relações simbióticas, ou seja, como as bactérias anammox interagem com outros micro-organismos, a exemplo das bactérias aeróbias nitritantes (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009). Portanto, compreender as relações que ocorrem entre uma comunidade de micro-organismos é chave para o sucesso da aplicação dos mesmos nos sistemas de tratamento de águas residuárias (Tao *et al.*, 2013).

Destaca-se que as bactérias nitrificantes apresentam boa adaptação às baixas concentrações de oxigênio nas interfaces óxicas-anóxicas. Em ambientes anóxicos, podem reduzir nitrito para  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$  quando o piruvato e o hidrogênio atuam como doadores de elétrons. No entanto, as bactérias anammox apresentam taxa específica de oxidação anaeróbia 50 vezes mais rápida dos que as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (Sliemers *et al.*, 2005).

Na Tabela 3.2 é apresentada uma sistematização de algumas pesquisas com micro-organismos e atividade anammox que testaram biomassas oriundas de inóculos de habitats naturais e antropizados, adotaram reatores como modelos de sistemas, avaliaram tempo para início e estabilização da atividade anammox, definiram parâmetros operacionais e que obtiveram sucesso no estabelecimento do processo anammox avaliado pelas taxas de remoção de nitrogênio. Em todos os experimentos, apresentados na Tabela 3.2, foi utilizada água residuária sintética nos sistemas biológicos testados.

Tabela 3.2: Inóculos e sistemas usados para enriquecimento e atividade anammox.

Origem do Inóculo / Sistema	Tipo de sistema testado	Início da atividade anammox	Estabilização da atividade anammox	Taxa de remoção de nitrogênio após estabilização (kg N.m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Referência
* Lagoa de sedimentação tratando efluente de usina de processamento de cana de açúcar <sup>(1)</sup>	RBS <sup>(2)</sup>	35-60 dias	90 dias	2,1	Sánchez <i>et al.</i> , 2014
* Lagoa aerada tratando efluente de refinaria de petróleo <sup>(1)</sup>	Biofiltros anaeróbios <sup>(2)</sup>	50 a 300 dias	300 dias	0,550	Costa, 2013a
* Wetland construído tratando esgoto doméstico <sup>(3)</sup>		55 a 145 dias	210 dias	0,350	Costa <i>et al.</i> , 2014
* Tanque anóxico tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>	Bioreator com membranas <sup>(2)</sup>	80 dias	175 dias	0,800	Tao <i>et al.</i> , 2013
* Reator anaeróbio tratando efluente de indústria processamento vegetais <sup>(1)</sup>	Frascos com culturas em bateladas	71 dias	130-140 dias	NA	Suneethi e Joseph, 2011
* Bioreator com membranas testado com água residuária sintética <sup>(2)</sup>	RBS <sup>(2)</sup>	49 dias	60-90 dias	NA	Wang <i>et al.</i> , 2011
* Lodos ativados tratando esgotos domésticos <sup>(1)</sup>	RBS <sup>(2)</sup>	87 dias	125 dias	NA	Araújo <i>et al.</i> , 2010
* RBS aeróbio tratando efluentes de abatedouros e de dejetos <sup>(1)</sup>	Frascos com culturas em bateladas	35 dias	70 dias	0,140	Bae <i>et al.</i> , 2010
* Sistema A2O tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>					
A) reator anaeróbio		35 dias	70 dias	0,140	
B) reator anóxico		35 dias	70 dias	0,140	
C) reator óxico		50 dias			
* Discos rotativos tratando dejetos animais <sup>(1)</sup>		ND <sup>(5)</sup>	ND <sup>(5)</sup>		
* Reator bateladas sequenciais anóxico tratando esgotos domésticos <sup>(2)</sup>	Frascos com culturas em bateladas	90 dias	-	NA	Sánchez-Melsió <i>et al.</i> , 2009
* Lodo de lagoas salobras		365 dias	-		
* Lodo de wetlands construídos tratando esgotos domésticos		365 dias	-		
* Reator anaeróbio tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>		365 dias	-		
* Lagoa desativada tratando dejetos suínos	Reatores tubulares com meio suporte	-	100 dias	0,290	Schierholt Neto, 2007
* Decantador secundário tratando dejetos suínos <sup>(1)</sup>		-	82 dias		
* Lodo de UASB <sup>(1) (4)</sup>	RBS <sup>(3)</sup>	90 dias	120 dias	NA	Chamchoi e Nitorisavut, 2007
* Lodos Ativados <sup>(1)</sup>					
* Lodo de Digestor <sup>(1)</sup>					

Continuação tabela 3.2 na próxima página

Continuação Tabela 3.2: Inóculos e sistemas usados para enriquecimento e atividade anammox.

Origem do Inóculo / Sistema	Tipo de sistema testado	Início da atividade anammox	Estabilização da atividade anammox	Taxa de remoção de nitrogênio após estabilização (kg N.m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Referência
* Lodos Ativados tratando efluente combinado de esgoto e chorume <sup>(1)</sup>	RBS <sup>(3)</sup>	70 dias	225 dias	NA	Vives <i>et al.</i> , 2007
* Discos Rotativos Submersos testando água residuária sintética <sup>(2)</sup>	Semi-bateladas	-	340 dias	0,700	Tsushima <i>et al.</i> , 2007a
* Reator nitrificante / desnitrificante tratando efluente indústria de aminoácidos <sup>(1)</sup>	Quimiostato	136 dias	274 dias	0,043	Martins, 2007
* Lodo de UASB tratando efluente de abatedouro de aves <sup>(4) (1)</sup>		136 dias	274 dias	0,043	
* reatores com membranas tratando esgoto doméstico <sup>(3)</sup>	Frascos com culturas em bateladas	ND <sup>(5)</sup>	ND <sup>(5)</sup>	ND <sup>(5)</sup>	Tsushima <i>et al.</i> , 2007b
* Bacia de desnitrificação tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>		223 dias	-	0,032	
* Discos rotativos nitrificantes tratando chorume <sup>(1)</sup>		171 dias	-	0,004	
* Valas de Oxidação tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>		64 dias	-	0,054	
* Bacia de desnitrificação tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>		143 dias	-	0,044	
* Valas de Oxidação tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>		203 dias	-	0,026	
* Digestor Anaeróbio tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>		107 dias	-	0,039	
* Tanque de Aeração tratando lodo de fossas <sup>(1)</sup>		54 dias	-	0,058	
* Bacia de desnitrificação tratando lodo de fossas <sup>(1)</sup>		69 dias	-	0,048	
* Discos rotativos tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>		ND <sup>(5)</sup>	ND <sup>(5)</sup>	ND <sup>(5)</sup>	
* Bacia de desnitrificação tratando esgoto doméstico <sup>(1)</sup>		37 dias	100 dias	0,083	

<sup>(1)</sup> EPL: escala plena; <sup>(2)</sup> EBA: escala bancada; <sup>(3)</sup> EPI: escala piloto; <sup>(4)</sup> UASB: Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e Fluxo Ascendente; <sup>(5)</sup> ND: Não Detectado; <sup>(6)</sup> NA: Não Apresentado



Portanto, tendo-se o conhecimento das condições e parâmetros operacionais que resultaram em sucesso na estabilização da atividade anammox e das condições limitantes ao desenvolvimento e crescimento das populações de micro-organismos anammox pode contribuir para novas pesquisas buscando inóculos em habitats naturais ou antropizados. O Brasil, devido à sua extensão territorial e diversidade de condições ambientais, permite a ocorrência de uma grande diversidade biológica e, assim, testar a viabilidade de diferentes inóculos para a atividade anammox é importante para quando essa alternativa de tratamento se tornar predominante. Dessa forma, sedimentos de lagos, sistemas anaeróbios e facultativos para tratamento de efluentes de abatedouros e lagoas de acumulação de chorume parecem reunir condições para o estabelecimento e crescimento de micro-organismos anammox.

Além do mais, o estudo da viabilidade de novos inóculos para aplicação em processos biológicos visando a atividade anammox pode ampliar o espectro genético, ecológico e de micro-organismos existentes e pode auxiliar no monitoramento dos sistemas de tratamentos de águas residuárias.

### **3.3 - MICRO-ORGANISMOS ENVOLVIDOS NA REMOÇÃO DE NITROGÊNIO**

As biomassas constituintes dos sistemas de tratamentos biológicos para remoção de nitrogênio são compostas por uma diversidade de micro-organismos, principalmente dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*, que podem interagir em relações simbióticas e competitivas.

Os micro-organismos são empregados no tratamento de águas residuárias, pois podem utilizar uma série dos componentes presentes nesses efluentes como substratos para os seus processos metabólicos. O nitrogênio, um dos principais poluentes em águas residuárias, pode apresentar-se em diferentes estágios de oxidação, favorecendo a oxidação e/ou redução por processos diferentes (Figura 3.10).

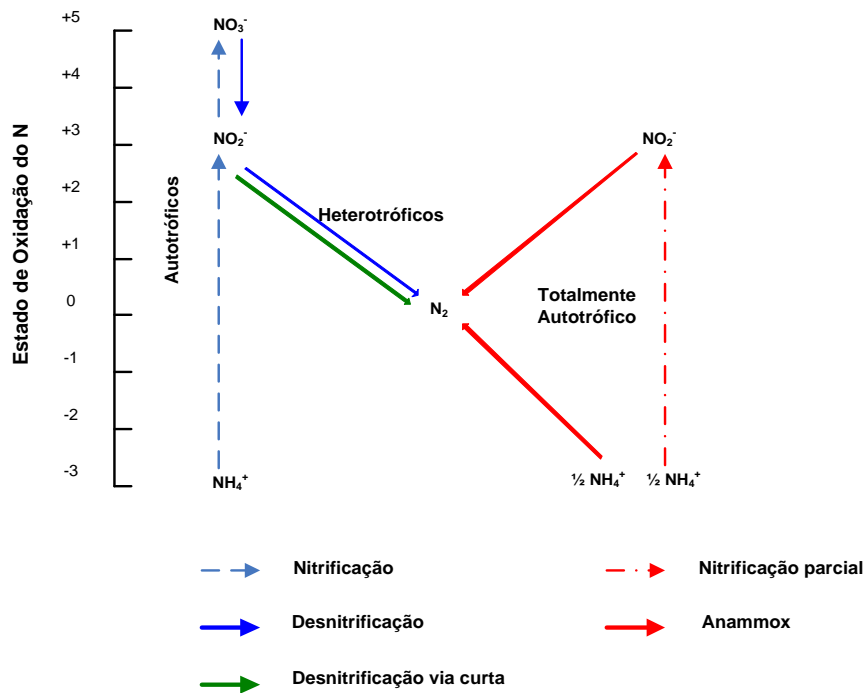


Figura 3.10: Principais estados de oxidação do nitrogênio e processos biológicos possíveis para a oxidação e/ou redução. Fonte: Adaptado de <http://www.aresta.jawnet.pl/> (acesso em 10 de março de 2011).

Os diferentes organismos realizam os seus processos metabólicos pelas mais diversas rotas metabólicas (Tortora *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2010). Essa diferenciação quanto ao tipo de substrato necessário e a forma de obtenção de energia é que torna tão importante a presença de uma comunidade de micro-organismos atuando nos processos de tratamento. Diferentes rotas metabólicas e enzimas envolvidas na ciclagem de nitrogênio por micro-organismos estão apresentados na Figura 3.11, conforme proposto por Vlaeminck *et al.* (2011).

Há três grupos principais de bactérias quimiolitototróficas que podem ser utilizadas para remoção de nitrogênio de águas residuárias: as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (BOA), as bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito (BON) e as bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia (Schmidt *et al.*, 2003). Todas obtêm energia para o crescimento microbiano a partir de compostos inorgânicos de nitrogênio. Destaca-se a possibilidade de nitrificação por outros grupos de bactérias e *Archaea* heterotróficas e mixotróficas.

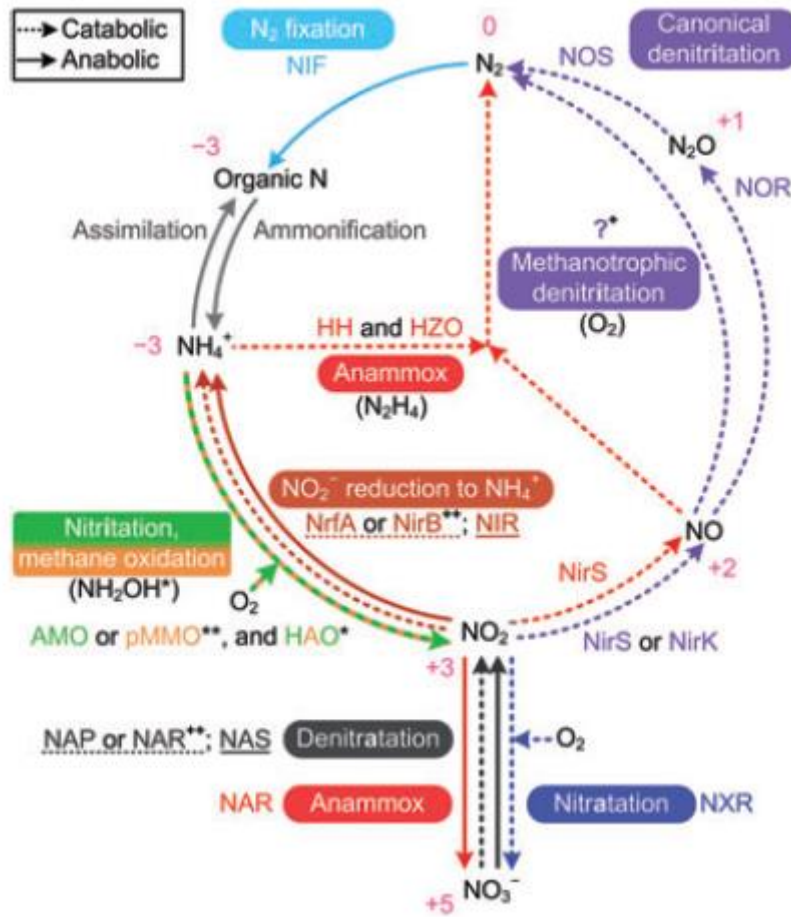
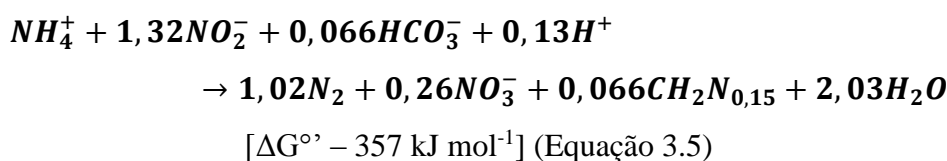
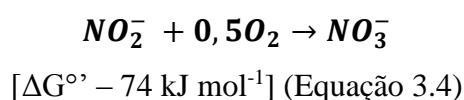
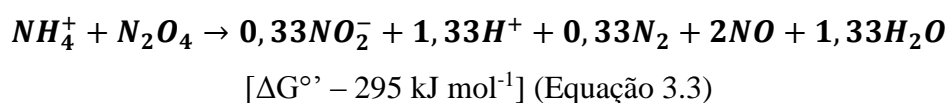
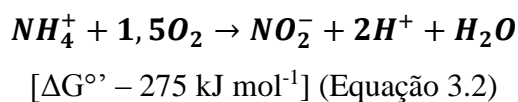


Figura 3.11: Ciclagem do nitrogênio conduzida por micro-organismos por catabolismo (setas pontilhadas) e anabolismo (setas cheias). Os estágios de oxidação do nitrogênio são indicados em rosa e os estágios intermediários entre parênteses. AMO (amônia mono-oxigenase); HAO (hidroxilamina oxireductase); HH (hidrazina hidrolase); HZO (hidrazina oxireductase); NAP (nitrito redutase periplasmática); NAR (nitrito redutase em membrana); NAS (nitrito redutase citoplasmática); NIF (nitrogenase); NIR e NirB (nitrito redutases); NirK (nitrito redutase contendo Cu); NirS (nitrito redutase citocromo *cd*<sub>1</sub>); NOR (óxido nítrico redutase); NOS (óxido nítrico redutase); NrfA (nitrito redutase citocromo *c*); NXR (nitrito oxireductase); pMMO (metano mono-oxigenase particulado).  
 Fonte: Vlaeminck *et al.* (2011).

As reações químicas conduzidas pelos organismos quimiolitotróficos que usam os compostos de nitrogênio são apresentadas abaixo, bem como a energia livre oriunda de cada uma dessas reações. Nas equações 3.2 e 3.3 têm-se as reações possíveis para as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia. Na equação 3.4 a reação conduzida por bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito e em 3.5 a reação conduzida por bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia (Strous *et al.*, 1998).



As reações de oxidação aeróbia e anaeróbia da amônia são as que apresentam maiores liberações de energia livre, demonstrado pela variação da energia de Gibbs. Quanto maior a possibilidade de oxidação de um substrato, maior será a liberação de energia da reação que poderá ser convertida para os processos de síntese celular (Comeau, 2008).

As bactérias aeróbias oxidadoras de amônia formam dois grupos monofiléticos:  $\gamma$  Proteobacteria (*Nitrosococcus*) e  $\beta$  Proteobacteria (*Nitrosomonas* e *Nitrospira*) (Schmidt *et al.*, 2003). Ahn (2006), ainda cita as bactérias *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus*, pertencentes à  $\beta$  Proteobacteria, como organismos com essa habilidade. Ainda que sejam consideradas como quimiolitautotróficas, tem sido registrado o uso por elas de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Além das bactérias litototróficas, tem-se citado bactérias heterotróficas e fungos como organismos capazes de oxidar biologicamente a amônia a nitrito (Udert *et al.*, 2005).

Schmidt *et al.* (2003), relataram a presença conjunta de diferentes gêneros como *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio* em estações de tratamento de águas residuárias em estações de tratamento de águas residuárias na Europa.

As enzimas envolvidas e os locais celulares onde ocorre o processo de oxidação aeróbia da amônia pelas bactérias nitrificantes são apresentados na Figura 3.12.

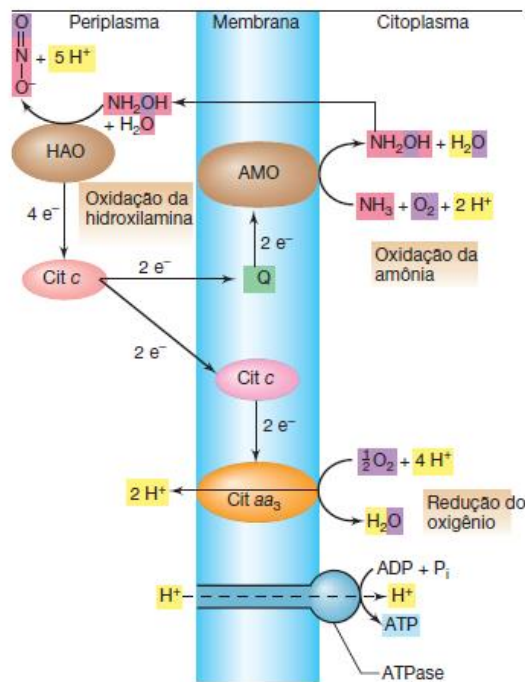


Figura 3.12: Oxidação da amônia e fluxo de elétrons em bactérias oxidadoras de amônia. Os reagentes e produtos dessa série de reações encontram-se destacados. AMO: enzima amônia mono-oxigenase; HAO: enzima hidroxilamina oxidoredutase; Q: ubiquinona (Madigan *et al.*, 2004).

A oxidação biológica do nitrito é realizada principalmente pelas bactérias quimiolitotróficas e, adicionalmente, por alguns micro-organismos heterotróficos (Udert *et al.*, 2005). Entre os organismos quimiolitotróficos destaca-se as bactérias aeróbias *Nitrobacter* e *Nitrococcus* pertencentes ao grupo  $\alpha$  Proteobacteria (Schmidt *et al.*, 2003). *Nitrospira*, também bactérias aeróbias oxidadora de nitrito, estão em uma divisão isolada, Nitrospirae (Youssef, 2014). *Nitrospira* é o oxidador de nitrito mais especializado. Os demais grupos são mais versáteis, podendo atuar como autotróficos facultativos e anaeróbios, sendo capazes de crescer em substratos ricos em carbono. Incluem-se as bactérias *Nitrospina* (Nitrospinae) e *Nitrocystis* como oxidadores de nitrito (Ahn, 2006). As enzimas envolvidas e os locais celulares onde ocorre o processo de oxidação aeróbia do nitrito pelas bactérias nitrificantes são apresentados na Figura 3.13.

A forma de utilização de substrato por *Nitrosomonas* (BOA) e *Nitrobacter* (BON) fazem com que essas bactérias sejam classificadas como *r-estrategistas*, pois apresentam baixa afinidade ao substrato, mas têm taxas altas de reação em concentrações altas de substrato. Enquanto, *Nitrospira* (BOA) e *Nitrospira* (BON) são classificadas como organismos *k-estrategistas*, tendo alta afinidade pelo substrato, mas baixa taxa de reação em concentrações

altas de substrato (Kim *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010).

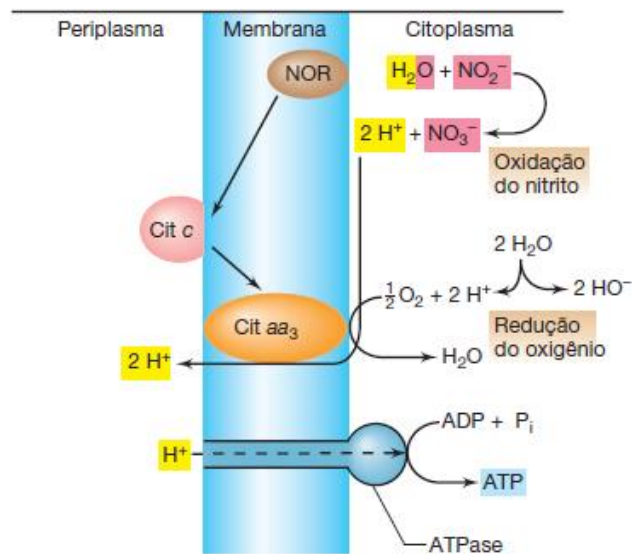


Figura 3.13: Oxidação de nitrito a nitrato por bactérias nitrificantes. Os reagentes e produtos dessa série de reações encontram-se destacados. NOR: enzima nitrito oxireductase (Madigan *et al.*, 2004).

Os micro-organismos capazes de oxidar anaerobicamente a amônia usando o nitrito como acceptor de elétrons são conhecidos como bactérias anammox devido justamente à essa habilidade metabólica. Na mais recente classificação biológica tem-se as bactérias anammox pertencentes ao Domínio *Bacteria*; Filo Planctomycetes; Classe Planctomycetia; Ordem Brocadiales; Família *Candidatus Brocadiaceae* e os Gêneros “*Candidatus Brocadia*”, “*Ca. Kuenenia*”, “*Ca. Scalindua*”, “*Ca. Anammoxoglobus*” e “*Ca. Jettenia*” (Jetten *et al.* 2011; Ludwig *et al.*, 2011).

Os micro-organismos anammox com os seus gêneros “*Candidatus Brocadia*”, “*Ca. Kuenenia*” e “*Ca. Scalindua*” (Schmid *et al.*, 2005); “*Ca. Anammoxoglobus*” (Kartal *et al.*, 2007) e “*Ca. Jettenia*” (Quan *et al.*, 2008) formam um ramo monofilético que os distancia dos demais micro-organismos agrupados no mesmo filo, diferindo-os na ordem Brocadiales (Ludwig *et al.*, 2011).

Reconhecem-se 18 bactérias como candidatas a espécies desse grupo anammox, sendo “*Candidatus Brocadia anammoxidans*” (Schmid *et al.*, 2001), “*Ca. Brocadia fulgida*” (Kartal

*et al.*, 2004), “*Ca. Brocadia sinica*” (Hu *et al.*, 2010), “*Ca. Brocadia brasiliensis*” (Araújo *et al.*, 2011), “*Ca. Brocadia carolinensis*” (Vanotti *et al.*, 2011; Rothrock *et al.*, 2011) “*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*” (Schmid *et al.*, 2001; Strous *et al.*, 2006), “*Ca. Scalindua wagneri*” (Schmid *et al.*, 2003), “*Ca. Scalindua brodae*” (Schmid *et al.*, 2003), “*Ca. Scalindua sorokinii*” (Kuypers *et al.*, 2003), “*Ca. Scalindua arabica*” (Woebken *et al.*, 2008), “*Ca. Scalindua profunda*” (van de Vossenberg *et al.*, 2008), “*Ca. Scalindua marina*” (Brandsma *et al.*, 2011), “*Ca. Scalindua richardsii*” (Fuchsman *et al.*, 2012), “*Ca. Scalindua pacifica*” (Dang *et al.*, 2013), “*Ca. Anammoxoglobus propionicus*” (Kartal *et al.*, 2007), “*Ca. Jettenia asiatica*” (Quan *et al.*, 2008). Sendo também citadas “*Ca. Scalindua sinoilfied*”, “*Ca. Scalindua zhenghe*” num estudo realizado por Sonthiphand *et al.* (2014).

Ocorre a hipótese que os Planctomycetes sejam uma linhagem antiga e, assim, houve tempo para evoluir formando gêneros individuais bem separados filogeneticamente (Schmid *et al.*, 2005). Supõe-se que a biodiversidade genética e molecular desse grupo seja muito maior que de Proteobacteria (Schmidt *et al.*, 2003; Kartal *et al.*, 2012). Um arranjo do Filo Planctomycetes apresentando as distâncias filogenéticas baseadas em sequências de DNA que codificam o RNAr 16S entre os grupos de micro-organismos sem (Ordem Planctomycetales) e com habilidade para a oxidação anaeróbia da amônia (Ordem Brocadiales) é mostrado na Figura 3.14 (Ludwig *et al.*, 2011; Jogler *et al.*, 2012;).

Atualmente toda a sistemática dos micro-organismos está baseada no Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica que considera as identificações por análises de sequências genéticas. Considerando o filo Planctomycetes, as análises comparativas de sequências de genes para RNAr 16S mostram uma divergência maior que 15% entre as bactérias anammox (Brocadiales) e as demais da ordem Planctomycetales (Jetten *et al.*, 2011). Schmid *et al.* (2000), destacaram que a similaridade entre as sequências desses dois grupos de bactérias é em torno de 79%.

De acordo com Jetten *et al.* (2011), o valor limiar tipicamente usado para separar espécies é de 3% de divergência entre as sequências de DNA obtidas pela amplificação dos genes que codificam o RNAr 16S. Para os micro-organismos anammox quando obtidos índices de similaridades, entre genes para RNAr 16S, inferiores a 95% tem-se agrupados em gêneros diferentes. Assim, por exemplo, as sequências de DNA considerando o RNAr 16S dos gêneros “*Ca. Brocadia*” e “*Ca. Kuenenia*” são similares em apenas 90,5% (Schmid *et al.*, 2000).

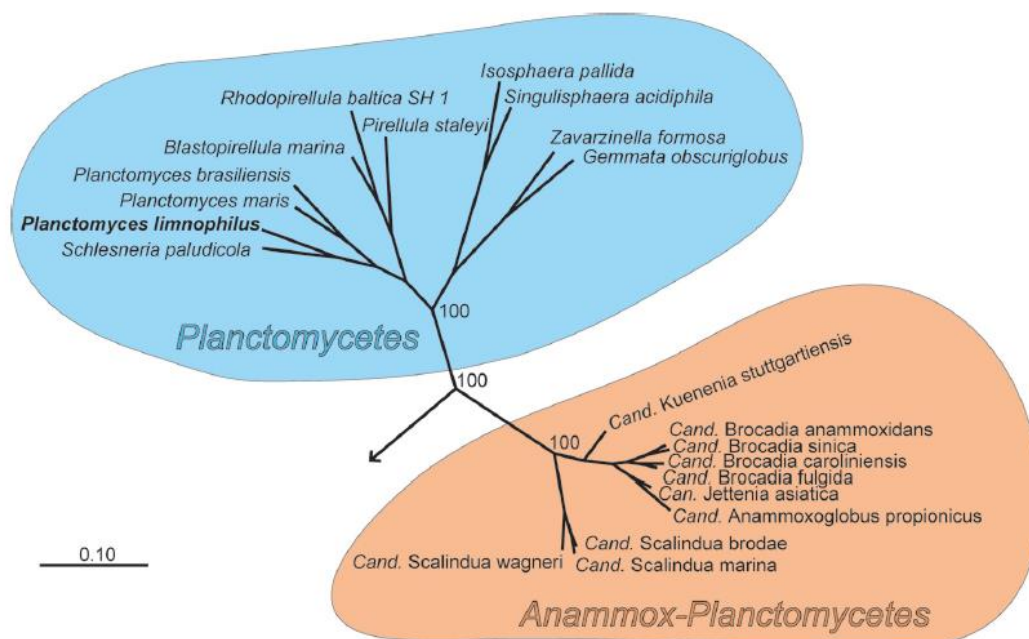


Figura 3.14: Árvore filogenética da Classe Planctomycetia dividida em duas prováveis ordens, baseada na sequência dos genes que codificam o RNAr 16S. *Escherichia coli* foi escolhida como *outgroup*. A barra representa 10% de divergência nas sequências (Jogler *et al.*, 2012).

Atualmente, para todas as candidatas a espécies do grupo anammox, encontram-se disponíveis, em bibliotecas genômicas, o sequenciamento completo ou parcial dos genes codificadores para RNAr 16S, espaço intergênico 16S-23S, RNAt e RNAr 23S permitindo-se a realização de inferências filogenéticas entre sequências de DNA obtidas em pesquisas que buscam micro-organismos e atividade anammox (Tabela 3.3).

Em análise de amostras de lodos, provenientes de diferentes tipos de reatores e de águas residuárias, por técnicas de biologia molecular usando o RNAr 16S, têm-se detectado predominantemente bactérias anammox próximas, relacionadas filogeneticamente, a “*Candidatus Brocadia*” e “*Ca. Kueneria*” independentemente da localidade e do tempo de atividade anammox (Tabela 3.4). Os micro-organismos relacionados à “*Ca. Scalindua*” são citados por desempenharem papel fundamental no ciclo do nitrogênio em ambientes subóxicos marinhos e em estuários, mas raramente são registrados em estações de tratamento (Schmid *et al.*, 2005). O estudo de Sonthiphand *et al.* (2014) corrobora para a hipótese de especificidade de habitats para os diferentes grupos anammox.



Pelo fato de não se ter conseguido, ainda, o isolamento das bactérias pertencentes ao grupo anammox, permanece o prefixo *Candidatus* para todas as espécies classificadas até o momento, de acordo com as regras do Código Bacteriológico, LPSN (Strous *et al.*, 1999a; Jetten *et al.*, 2011; Kartal *et al.*, 2012; Youssef *et al.*, 2014).

Tabela 3.3: Situação do sequenciamento de genes codificadores do RNAr 16S de bactérias anammox para inferências filogenéticas.

Gene / situação sequenciamento	Micro-organismos	Número acesso NCBI**	Referência
► RNAr 16S (completo)	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> *	AF375994	Schmid <i>et al.</i> , 2001
	<i>Ca. Brocadia sinica</i> *	AB565477	Oshiki <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ca. Brocadia caroliniensis</i>	JF487828	Vanotti <i>et al.</i> , 2011; Rothrock <i>et al.</i> , 2011
	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> *	AF375995	Schmid <i>et al.</i> , 2001
	<i>Ca. Jettenia asiatica</i> *	DQ301513	Quan <i>et al.</i> , 2008
	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i> *	EU478694	Woebken <i>et al.</i> , 2008
	► RNAr 16S (parcial)	<i>Ca. Brocadia fulgida</i> *	EU478693
<i>Ca. Brocadia brasiliensis</i>		GQ896513	Araújo <i>et al.</i> , 2011
<i>Ca. Scalindua wagneri</i> *		EU478692	Woebken <i>et al.</i> , 2008
<i>Ca. Scalindua brodae</i>		AY254883	Schmid <i>et al.</i> , 2001
<i>Ca. Scalindua sorokinii</i>		AY257181	Kuypers <i>et al.</i> , 2003
<i>Ca. Scalindua marina</i>		EF602039	Brandsma <i>et al.</i> , 2011

\*Espécies com o sequenciamento completo ou parcial para os genes que codificam o espaço intergênico 16S-23S, RNAt e RNAr 23S. \*\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

As bactérias anammox apresentam-se como células cocóides (Figura 3.15A) gram-negativas e possuem uma morfologia irregular incomum, conforme apresentado na Figura 3.15B (Jetten *et al.*, 1999).

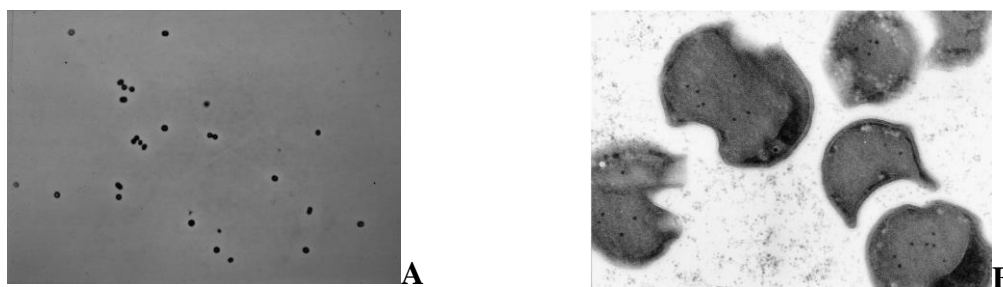


Figura 3.15: A: Micrografia de células em forma de cocos presentes nas culturas enriquecidas anammox. B: Micrografia eletrônica de biomassa suspensa de micro-organismos anammox. Jetten *et al.*, 1999.

Tabela 3.4: Caracterização de bactérias anammox em sistemas biológicos para remoção de nitrogênio, com base no RNAr 16S.

Origem inóculo <sup>1</sup>	Tipo de análise	Filogenia (% de similaridade)	Tempo experimento	Sistema experimento	Cidade, País Autores
Tanque aeração <sup>2</sup> - chorume	FISH, PCRq	<i>Ca. Kuenenia</i> (99%) <i>Ca. Brocadia</i> (93%) <i>Ca. Jettenia</i> (92%)	200 dias	UASB <sup>3</sup> - ars <sup>5</sup>	Jhinan, China Ni <i>et al.</i> 2011
Lagoa sedimentação <sup>2</sup> - usina de açúcar	FISH, PCR	<i>Ca. Kuenenia</i> <i>Ca. Brocadia</i>	100 dias	RBS <sup>4</sup> - ars <sup>5</sup>	Valle del Cauca, Colômbia Sánchez <i>et al.</i> , 2014
Tanque aeração <sup>2</sup> - chorume	FISH, PCR	<i>Ca. Kuenenia</i> (99%) <i>Ca. Brocadia</i> (93%) <i>Ca. Jettenia</i> (92%)	100 dias	Tanques aeração (0,3 mg OD.L <sup>-1</sup> ) - chorume	Taiwan, China Wang <i>et al.</i> , 2010
Lodo anammox Austria <sup>3</sup>	PCR, PCRq, DGGE e Sequenc.	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> e <i>Ca. Brocadia fulgida</i> (antes) para <i>Ca. Brocadia</i> sp40 (depois)	380 dias	RBS <sup>4</sup> - eda <sup>6</sup>	Nova York, EUA Park <i>et al.</i> , 2010
Lodos Ativados <sup>2</sup> - esgoto		<i>Ca. Brocadia</i> sp40	380 dias	Canon <sup>4</sup> - eda <sup>6</sup>	
Discos rotativos submersos <sup>4</sup>	FISH, PCRq; PCR, Clonagem RNAr 16S e Sequenc.	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> (92%) Planctomycete KSU-1 (95%)	390 dias	Culturas semi bateladas <sup>4</sup> - ars <sup>5</sup>	Sapporo, Japão Tsushima <i>et al.</i> , 2007a
Sedimento rio	PCR, Clonagem RNAr 16S e Sequenc.	Planctomycete KSU-1 (95%) - 15 bibliotecas clônicas <i>Ca. Brocadia fulgida</i> (98%) - 1 biblioteca clônica	360 dias	UASB <sup>4</sup> - ars <sup>5</sup>	Shangai, China Quan <i>et al.</i> , 2008
Valos de Oxidação - esgoto		<i>Ca. Brocadia</i> sp40 (99%)	134 dias		Tucson, Arizona, EUA
Retorno lodos ativados - esgoto		<i>Ca. Brocadia</i> sp40 (99%)	50 dias		Tucson, Arizona, EUA
Retorno lodos ativados - esgoto	PCR, Clonagem RNAr 16S e Sequenc.	<i>Ca. Kuenenia</i> (99%)	204 dias	Culturas em bateladas - ars <sup>5</sup>	Valencia, Califórnia, EUA
Retorno lodos ativados - esgoto		<i>Ca. Kuenenia</i> (99%)	204 dias		San Jose, Califórnia, EUA
Bioreator de membranas - esgoto		<i>Ca. Kuenenia</i> (99%)	134 dias		Lancaster, Califórnia, EUA Sun <i>et al.</i> , 2011

Continuação da tabela 3.4 na próxima página

Continuação da Tabela 3.4: Caracterização de bactérias anammox em sistemas biológicos para remoção de nitrogênio, com base no RNAr 16S.

Origem inóculo <sup>1</sup>	Tipo Análise	Filogenia	Tempo experimento	Sistema experimento	Cidade, País Autores
RBS <sup>2</sup> – esgoto e dejetos animais					
Sistema A2O <sup>2</sup> - anaeróbico - esgoto	PCR, PCRq, Clonagem	Planctomycete KSU-1 (99%)	Avaliação do inóculo - 0 dia	Culturas em bateladas -ars <sup>5</sup>	Seul, Coreia do Sul Bae <i>et al.</i> , 2010
Sistema A2O <sup>2</sup> - anóxico -esgoto	RNAr 16S e	Possíveis novos candidatos a gêneros anammox (79,8% com as atuais candidatas anammox)			
Sistema A2O <sup>2</sup> - óxico - esgoto	Sequenc.				
Discos biológicos rotativos <sup>2</sup> - dejetos animais					
Digestor anaeróbico – glu mons <sup>7</sup>		<i>Ca. Brocadia sinica</i> (100%); <i>Ca. Anammoxoglobus</i>	900 dias	CSTR <sup>8</sup> - glu mons <sup>7</sup>	
Mix anaeróbico e nitrificação – ars <sup>5</sup>		<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> (98%)	540 dias	UBF <sup>9</sup> - ars <sup>5</sup>	
Reator CSTR <sup>8</sup> – ars <sup>5</sup>	PCR, PCRq, Clonagem	<i>Ca. Brocadia</i> (97-99%)	540 dias	Leito expandido – ars <sup>5</sup>	China Hu <i>et al.</i> , 2010
Digestor anaeróbico – ars <sup>5</sup>	RNAr 16S e	<i>Ca. Brocadia</i> (97-99%)	420 dias	UASB - ars <sup>5</sup>	
Digestor anaeróbico – ars <sup>5</sup> açúcar	Sequenc.	<i>Ca. Brocadia</i> ; <i>Ca. Anammoxoglobus</i>	420 dias	UASB - ars <sup>5</sup> + açúcar	
Digestor anaeróbico – ars <sup>5</sup>		<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> (98%)	420 dias	UASB - ars <sup>5</sup>	
Digestor anaeróbico – ars <sup>5</sup>		<i>Ca. Brocadia</i> (97-99%)	600 dias	Leito expandido - ars <sup>5</sup>	
Sistema nitrificação – ars <sup>5</sup>		<i>Ca. Brocadia</i> (97-99%)	360 dias	UASB - ars <sup>5</sup>	
Tanque anóxico <sup>2</sup> - esgoto					
Tanque anóxico <sup>2</sup> com lavagens - esgoto	PCR, PCRq, T-RFLP;	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>	175 dias	MBBR <sup>10</sup> – ars <sup>5</sup>	Harbin e Beijing, China Tao <i>et al.</i> , 2013
Tanque anóxico <sup>2</sup> - esgoto + biomassa anammox UASB <sup>3</sup> com <i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	FISH				

<sup>1</sup> Origem inóculo: Sistema e água residuária tratada; <sup>2</sup> Escala plena; <sup>3</sup> Escala piloto; <sup>4</sup> Escala bancada; <sup>5</sup> ars: água residuária sintética; <sup>6</sup> eda: efluente digestor anaeróbico; <sup>7</sup> glu mons: glutamato monossódico; <sup>8</sup> CSTR: continuous stirred-tank reactor; <sup>9</sup> UBF: upflow anaerobic sludge bed-filter; <sup>10</sup> MBBR: moving bed biofilm reactors

A morfologia irregular incomum das células dos micro-organismos anammox observada em microscopia eletrônica por Jetten *et al.* (1999), está associada à uma estrutura celular intracitoplasmática, definida e exclusiva para os organismos anammox, o anamoxossomo. Essa estrutura tem uma delicada membrana impermeável devido aos lipídeos *ladderane* que a compõe (Lindsay *et al.*, 2001) e é nela que ocorre parcialmente o catabolismo anammox (Kuenen, 2008; Kartal *et al.*, 2012). Numa revisão apresentada por Schmidt *et al.* (2003), pode-se melhor observar essa estrutura por uma imagem de microscopia eletrônica, como mostrado na Figura 3.16.

Essa estrutura, o anamoxossomo, permite a realização de estimativas do número de células anammox em comunidades microbianas antes e após períodos destinados ao enriquecimento, pela sua observação em microscopia eletrônica (Jetten *et al.*, 1999).

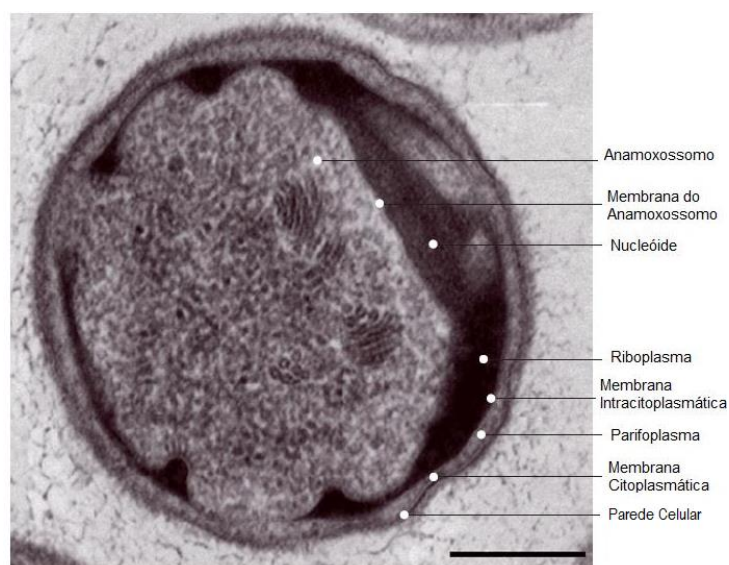


Figura 3.16: Ultraestrutura da bactéria anammox *Candidatus 'Kuenenia stuttgartiensis'*. Escala da barra representa 200nm (Schmidt *et al.*, 2003; Kuenen, 2008).

As taxas de crescimento das bactérias que realizam o processo anammox são extremamente lentas, resultando na necessidade de tempos elevados de detenção celular (Schmid *et al.*, 2005). Jetten *et al.* (1999) calcularam o tempo gasto para duplicação das bactérias em reatores de leito fixo e em bateladas sequenciais, obtendo 29 e 11 dias, respectivamente. Essa diferença foi devida a uma detenção celular mais eficiente e distribuições mais

homogêneas de substratos, produtos e biomassa no reator em bateladas sequenciais.

No entanto, tem-se registrado tempos de duplicação significativamente menores para esses micro-organismos dependendo dos sistemas e parâmetros de controle operacionais adotados. Tsushima *et al.* (2007a) obtiveram tempos de duplicação de 3,6 a 5,4 dias em culturas enriquecidas, após 400 dias em modo de culturas em bateladas escala bancada, com inóculos provenientes de um reator com discos rotativos submersos. Tanto no reator que originou o inóculo, quanto nas culturas em bateladas, utilizou-se água residuária sintética com adição dos substratos necessários.

O tempo médio de duplicação de bactérias anammox em sistema anaeróbio em bateladas com lodo granular após 150 dias e em reator CANON utilizando-se de biomassa fixa após 100 dias de operação foram de 5,3 e 8,7 dias, respectivamente. A diferença foi atribuída à limitação no transporte de substratos ocorrida no sistema com biofilme (Park *et al.*, 2010).

Bae *et al.* (2010), utilizando-se da análise de PCR quantitativa, estimaram o tempo de duplicação de 1,12 dias para culturas em bateladas após 70 dias de enriquecimento, tendo sido usada biomassa originária da mistura de três inóculos, sendo lodo de reator aeróbio em bateladas tratando dejetos animais, lodos de sistemas anaeróbios e anóxicos tratando esgotos domésticos.

É provável que o tempo de duplicação de bactérias anammox diferencie entre espécies candidatas, sobre as condições operacionais e tipos de reatores testados e, também, como resultado dos métodos de cálculos adotados tais como rendimento teórico de biomassa obtido pela taxa de remoção de nitrogênio, estimativas de crescimento populacional feitos por FISH (hibridização fluorescente *in situ*) e PCRq (reação em cadeia de polimerase quantitativa) (Tsushima *et al.*, 2007a).

A rota metabólica utilizada pelas bactérias anammox é considerada rara devido à produção de hidrazina ( $N_2H_4$ ) como composto intermediário. Os mecanismos atuantes no metabolismo anammox ainda não estão totalmente definidos (Bagchi *et al.*, 2012; Kartal *et al.*, 2012). Jetten *et al.* (1999), haviam proposto mecanismos possíveis para o processo metabólico anammox. Durante a oxidação da amônia a hidroxilamina seria usada como acceptor de elétrons, formando hidrazina. A conversão de hidrazina para gás nitrogênio geraria elétrons equivalentes para reduzir o nitrito para hidroxilamina (Figura 3.17).

Uma enzima similar a hidroxilamina oxidoredutase (HAO) presente nos organismos nitrificantes aeróbios poderia ser a responsável pelo processo de conversão da hidrazina para gás nitrogênio pelos organismos anammox. De acordo com Jetten *et al.* (1999), a enzima responsável pela conversão da hidrazina apresenta massa molecular menor do que a dos nitrificantes aeróbios, sequência única de aminoácidos em determinados fragmentos e possui vários citocromos tipo c.

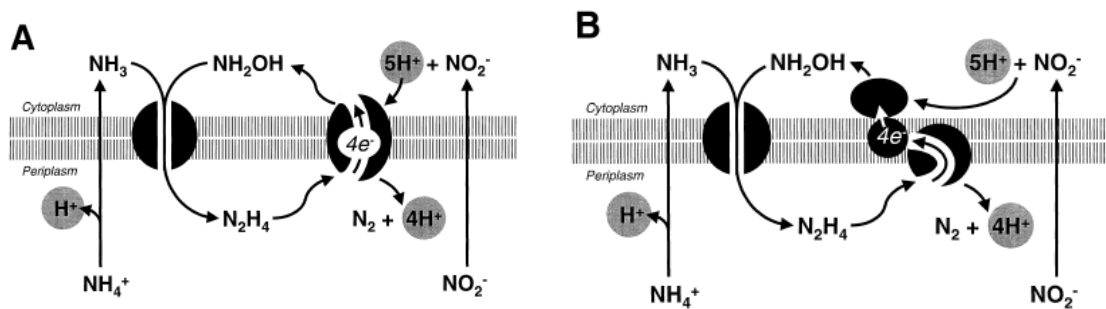


Figura 3.17: Mecanismos metabólicos possíveis e localização celular do sistema de enzimas envolvido na oxidação anaeróbica de amônia (Jetten *et al.*, 1999).

Posteriormente, com a identificação dos genes que codificavam as supostas enzimas relacionadas ao metabolismo anammox, foram postulados dois novos modelos para explicar o fluxo de energia e a formação de hidrazina conforme apresentado na Figura 3.18 (Kuenen, 2008).

No primeiro modelo, durante a oxidação da amônia usando o nitrito como aceptor de elétrons criar-se-ia uma força próton motriz (FPM) sobre a membrana do anamoxossomo (Figura 3.18a). O nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é reduzido para óxido nítrico (NO) que se combinaria com a amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) para gerar a hidrazina ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ), com o consumo de quatro elétrons de baixa energia. A redução da hidrazina para nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) renderia quatro elétrons de alta energia que fluiriam através de um complexo enzimático formado pela Quinona e o citocromo  $\text{bc}_1$  translocador de  $\text{H}^+$  formando assim uma força próton motriz positiva (FPM). A FPM energizaria o complexo ATPase translocador de próton para produção de ATP no riboplasma. Os elétrons seriam reciclados pelo grupo Quinona e citocromo oxidoredutase durante a reação de formação da hidrazina.

No segundo modelo, sugere-se uma rota metabólica na qual durante o processo catabólico a força próton motriz (FPM) comandaria a reversão na cadeia transportadora de elétrons ao combinar-se com a ação da enzima nitrato redutase para gerar ferredoxina usada na redução do dióxido de carbono na via metabólica acetil-CoA (Figura 3.18b). Esse mecanismo seria possível porque a hidrazina doaria elétrons de alta energia para a ferredoxina e esses não seriam reciclados, dessa forma, seria necessário à oxidação do nitrito a nitrato pela enzima nitrato redutase compensando essa perda de elétrons. Os elétrons de baixa energia seriam “energizados” pela FPM durante a oxidação anaeróbica da amônia.

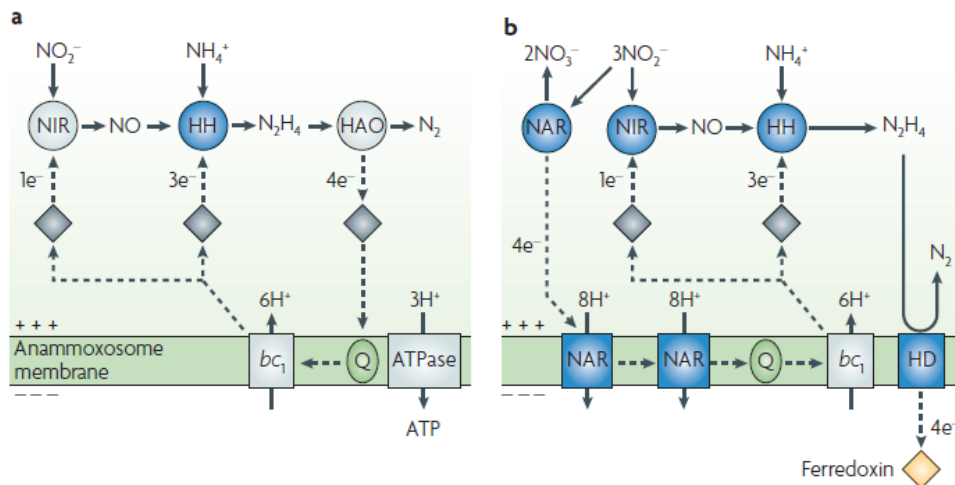


Figura 3.18: Catabolismo Hipotético e a reversão na cadeia transportadora de elétrons no anamoxossomo, estrutura celular das bactérias anamnox. HAO: enzima hidrazina oxidoreductase; HD: enzima hidrazina dehidrogenase; HH: enzima hidrazina hidrolase; NIR: enzima nitrito oxidoreductase; NAR: enzima nitrato redutase (Kuenen, 2008).

Tem-se, ainda, participando do ciclo do nitrogênio os micro-organismos desnitrificantes heterotróficos facultativos (quimiorganotróficos) e agrupam-se principalmente entre os gram-negativos das Classes  $\alpha$  e  $\beta$  das Proteobacteria, sendo os mais comuns *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Thiobacillus*. Há bactérias gram-positivas, como o gênero *Bacillus*, e algumas arqueias halofílicas como *Halobacterium* (Ahn, 2006). Existe a possibilidade da desnitrificação sendo realizada por bactérias litoautotróficas, fototróficas e por fungos. Nesse mecanismo os desnitrificantes utilizam compostos inorgânicos de enxofre, hidrogênio, amônia e nitrito como aceptores de elétrons (Ahn, 2006).

A versatilidade metabólica desses micro-organismos permite a eles que em determinadas situações aeróbias realizem a desnitrificação atuando com metabolismo autotrófico, citando-se as espécies de *Paracoccus*, *Magnetospirillum* e algumas cepas de *Pseudomonas* (Ahn, 2006).

Com o objetivo de demonstrar a estrutura filogenética dos grupos de micro-organismos envolvidos nos processos de oxidação dos compostos de nitrogênio é apresentada na Figura 3.19 a árvore filogenética partindo do último ancestral em comum (LUCA) conforme hipotetizado por Vlaeminck *et al.* (2011).

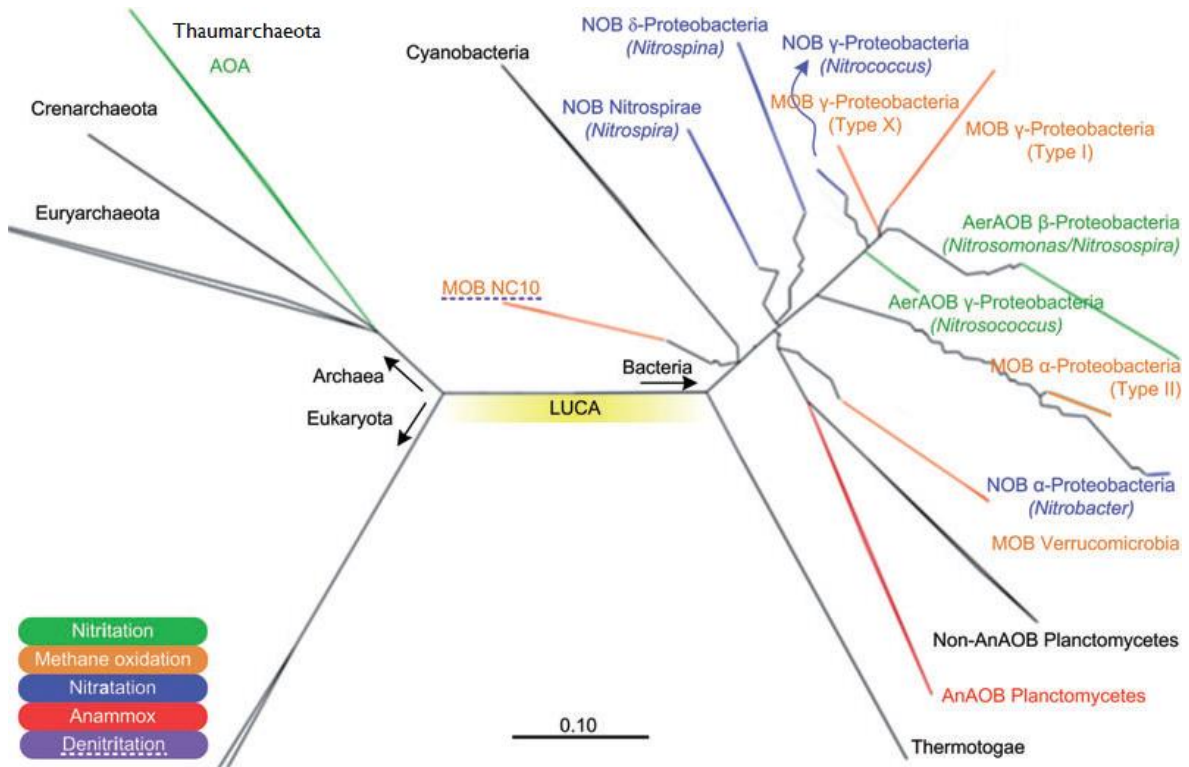


Figura 3.19: Árvore Filogenética destacando os organismos relacionados ao ciclo do nitrogênio baseada em seqüências de genes do RNA ribossomal 16S (Vlaeminck *et al.*, 2011).



### 3.4 - PARÂMETROS DE CONTROLE PARA O PROCESSO ANAMMOX

Em todos os novos arranjos de processos e sistemas biológicos para remoção de nitrogênio, o processo anammox é essencial e, portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de biomassa, com os micro-organismos responsáveis pelo processo, enriquecida e adaptada à remoção dos compostos nitrogenados de águas residuárias.

Para o desenvolvimento e adaptação da biomassa deve-se buscar conhecer os limites dos vários parâmetros operacionais e identificar condições para conferir vantagens competitivas às bactérias anammox dentro dos sistemas biológicos. Durante o período de partida dos sistemas visando a atividade anammox ocorrem interações interespecíficas na comunidade microbiana interferindo no sucesso de estabelecimento das bactérias oxidadoras anaeróbias de amônia. Vários grupos de bactérias que atuam no ciclo do nitrogênio estão presentes nos inóculos e as condições estabelecidas para os sistemas são determinantes para o sucesso de um ou mais grupos.

Vários parâmetros operacionais são importantes para ocorrência exclusiva e/ou simultânea dos processos biológicos em reatores, sendo eles: pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, tipos e concentrações de substratos, configurações de reatores, tempo de detenção hidráulica e de retenção de lodo, estratégias de alimentação, cargas de nitrogênio aplicadas (Ganigué *et al.*, 2007).

Os principais processos biológicos que concorrem nos sistemas visando atividade anammox são a nitrificação, nitratação, desnitrificação heterotrófica e degradação de carbono por bactérias heterotróficas mesófilas e a seguir é apresentado um quadro resumo das faixas de parâmetros que podem promover a ocorrência dos processos biológicos, em especial, o anammox (Tabela 3.5).

Nos sistemas biológicos visando a atividade anammox é desejável a formação de nitrito pelas bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (BOA) e a restrição da oxidação do nitrito a nitrato pelas bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito (BON). Dessa maneira, as concentrações de oxigênio dissolvido são determinantes para atuação de BOA e BON.

Tabela 3.5: Condições que promovem a ocorrência dos processos biológicos relacionados ao ciclo do nitrogênio.

Parâmetro	Nitritação	Nitratação	Desnitrificação heterotrófica	Degradação carbono orgânico	Anammox
OD	> 0,2	> 1,0	< 1,0	> 0,5	< 1,0
Temperatura	> 25°C				20 a 43°C
pH	≈ 7				6,7 a 8,3
Carbono orgânico	-	-	presente	presente	-
Nitrito					< 98,0
NH <sub>3</sub> livre*	< 250,0	< 1,0			-
Alcalinidade	4,05 mg CaCO <sub>3</sub> . mg <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub>	3,02 mg CaCO <sub>3</sub> . mg <sup>-1</sup> NO <sub>2</sub>			-

Concentrações em mg.L<sup>-1</sup>.

Uma das condições para que ocorra o processo competitivo entre as bactérias nitrificantes é a limitação de oxigênio dissolvido (Sliemers *et al.*, 2005). As bactérias aeróbias oxidadoras de amônia apresentam maior afinidade por oxigênio ( $V_{max}/K_s$ ) e em reatores com baixas concentrações de oxigênio pode ocorrer o acúmulo de nitrito. Concentrações reduzidas de oxigênio dissolvido são, também, importantes para garantir a contínua atividade dos organismos anammox.

O oxigênio dissolvido e as concentrações de amônia são fatores chaves determinando a eficiência do processo de nitratação parcial e, portanto, podem ser usados para controlá-lo. Liang e Liu (2008), registraram perturbações temporárias na estabilidade de um reator de nitratação parcial quando aumentos nas cargas de amônia e de oxigênio dissolvido ocorriam. Esses pesquisadores variaram gradualmente cargas de 0,27 a 1,2 kg N-NH<sub>4</sub>. m<sup>-3</sup>. dia<sup>-1</sup> e ajustes de oxigênio dissolvido de 0,8 a 2,3 mg.L<sup>-1</sup>.

Sliemers *et al.* (2002), desenvolveram uma estratégia para operação de um reator em bateladas sequenciais (RBS), em escala de bancada, visando a remoção de nitrogênio pelo sistema CANON, ou seja, atuação combinada dos micro-organismos aeróbios e anaeróbios oxidadores de amônia. Para estabilização da etapa de nitratação, a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida abaixo de 0,2 mg.L<sup>-1</sup>. Em outros dois estudos, visando a remoção das

formas nitrogenadas pela combinação dos processos nitrificação parcial, anammox e desnitrificação heterotrófica (SNAD), foram operados reatores de discos rotativos para remoção de nitrogênio mantendo o oxigênio dissolvido numa faixa de 0,5 a 0,7 mg.L<sup>-1</sup> (Chen *et al.*, 2009) e reatores em bateladas sequencias com concentrações de oxigênio dissolvido mantidas entre de 0,5 a 1 mg.L<sup>-1</sup> (Lan *et al.*, 2011).

Registra-se, também, que a versatilidade metabólica das bactérias aeróbias oxidadoras de amônia permite que as mesmas estejam presentes em condições anóxicas, no entanto, só efetuam a nitrificação quando o oxigênio é oferecido ao sistema. Esses organismos nitrificantes podem, inclusive, efetuar oxidação anaeróbia da amônia, mas em taxas 25 vezes menores do que aquelas observadas para biomassa anammox (Jetten *et al.*, 1999).

Conclui-se que em condições limitantes de oxigênio pode-se oferecer um ambiente adequado para uma interação estável entre micro-organismos aeróbios como as *Nitrosomonas* e bactérias anaeróbias como as do grupo *Brocadiales*, oxidadoras de amônia (Sliemers, *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010).

A temperatura e o pH são importantes parâmetros para as bactérias anammox que podem atuar numa faixa de 20 a 43°C, tendo seu ótimo a 40°C e pH na faixa de 6,7 a 8,3 com ótimo a 8 (Jetten *et al.*, 1999). A temperatura e o pH, definidos para os sistemas, pode auxiliar na exclusão de determinados processos devido à promoção de formação de substâncias inibidoras.

A temperatura influencia na taxa de oxidação da amônia e dessa maneira na acumulação de nitrito. Ou seja, quanto maior a temperatura, maior será a eficiência de remoção de amônia (Liang e Liu, 2007). No entanto, deve-se observar que em temperaturas elevadas ( $\pm$  35°C) promove-se a formação de amônia livre (Anthoniesen *et al.*, 1976).

As bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (BOA) têm seu metabolismo inibido pela amônia livre e pelo ácido nitroso. A toxicidade da amônia livre e do ácido nitroso depende do pH e da temperatura do licor do sistema. De acordo com Anthoniesen *et al.* (1976), o pH e a temperatura são os fatores que determinam as concentrações de amônia livre em equilíbrio com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N. A faixa de inibição da amônia livre para as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (BOA) é muito ampla, com registros de concentrações variando entre 10 e 150 mg.L<sup>-1</sup> (Kim *et al.*, 2006). No entanto, em meios com temperatura de 30 °C, pH 8,6 e concentrações de amônia livre e ácido nitroso oscilando entre 160-260 mg.L<sup>-1</sup> e 0,007-

0,019 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, não provocaram inibição às bactérias nitrificantes (Liang e Liu, 2008).

De acordo com Anthoniesen *et al.* (1976) as concentrações de amônia livre e de ácido nitroso são calculadas como funções do pH, temperatura e amônia/nitrito totais utilizando as Equações 3.6 a 3.9.

$$\text{Amônia livre (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Amônia total}}{1 + (\mathbf{10}^{-\text{pH}} / K_e^{NH})} \quad \text{(Equação 3.6)}$$

$$\text{Acido nitroso (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Nitrito total}}{1 + (K_e^{NO} / \mathbf{10}^{-\text{pH}})} \quad \text{(Equação 3.7)}$$

$$K_e^{NH} = e^{-6344/(273+T)} \quad \text{(Equação 3.8)}$$

$$K_e^{NO} = e^{-2300/(273+T)} \quad \text{(Equação 3.9)}$$

As bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito (BON) são sensíveis até mesmo a baixas concentrações de amônia livre. Concentrações de 0,1 a 1 mg.L<sup>-1</sup> são suficientes para causar inibição ao metabolismo das bactérias oxidadoras de nitrito (Kim *et al.*, 2006). O nitrito é um substrato que se pretende acumular, pois é necessário para bactérias anammox como aceptores de elétrons (Liang e Liu, 2007).

Ressalta-se que a combinação de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia com bactérias anammox limita a geração de subprodutos, tais como os óxidos nítricos e nitrosos (Sliemers *et al.*, 2005).

Em condições ótimas para *Nitrosomonas* (BOA) e *Nitrobacter* (BON) tem-se rendimento em biomassa de 0,15 mg células.mg<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>-N e 0,02 mg células.mg<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, respectivamente, para taxas de consumo oxigênio de 3,16 mg O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>-N e 1,11 mg O<sub>2</sub>.mg<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N e, ainda, um consumo de alcalinidade em ordem de 4,05 mg CaCO<sub>3</sub>.mg<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>-N para a nitrificação e de 3,02 mg CaCO<sub>3</sub>.mg<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub>-N (Ahn, 2006).

Dessa forma, por meio da manutenção do pH entre 7,5 e 8,5, temperatura em torno de 32°C, concentrações de amônia entre 100 e 1000 mg.L<sup>-1</sup> e de amônia livre em até 250 mg.L<sup>-1</sup>, promove-se o crescimento de organismos oxidadores de amônia e inibe-se o desenvolvimento das bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito. Para as bactérias nitrificantes, em baixas concentrações de oxigênio dissolvido, a temperatura deve estar acima de 25 °C e o pH próximo ao neutro (Egli *et al.*, 2003; Aslan *et al.*, 2009).

No desenvolvimento da biomassa anammox, as bactérias desnitrificantes heterotróficas são importantes competidores, pois atuam em condições anaeróbias consumindo o substrato nitrito. No entanto, esses micro-organismos dependem de carbono orgânico no meio para realizarem o metabolismo. Assim, em sistemas de tratamento de águas residuárias pelo processo convencional é necessária introdução de fonte externa de carbono e ou recirculações para completar a etapa de desnitrificação heterotrófica (Dapena-Mora *et al.*, 2004; Ganigué *et al.*, 2007; Liang & Liu, 2007).

Na busca por um mecanismo ótimo de remoção de nitrogênio, o carbono orgânico presente nas águas residuárias deve ser consumido pelas bactérias desnitrificantes heterotróficas que o usará como fonte de carbono e energia (Wang *et al.*, 2010). É interessante ajustar a ocorrência de desnitrificação, em condições sub-óxicas, para ocorrer concomitantemente com a nitrificação em reatores destinados a condicionar à água residuária à relação molar de 1:1,32 mol entre amônia (NH<sub>4</sub>) e nitrito (NO<sub>2</sub>) necessária à reação anammox. Geralmente, nesses sistemas recircula o efluente do reator anammox de volta para o reator de nitrificação/desnitrificação para consumo do nitrato pelas bactérias desnitrificantes.

Também, concorrendo nos sistemas de tratamento para remoção de nitrogênio, tem-se as bactérias heterotróficas mesófilas que estabilizam os compostos orgânicos presentes nas águas residuárias e disputam o oxigênio dissolvido com as BOA e o carbono orgânico com as bactérias desnitrificantes (Kim *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2013). Dessa maneira, para o tratamento de determinadas águas residuárias com altas concentrações de matéria orgânica por processos combinados de nitrificação e anammox deve-se aumentar a concentração de oxigênio dissolvido disponível. No estudo realizado por Liang e Liu (2007), tratando chorume em reatores de fluxo ascendente e de leito fixo, quando as cargas aplicadas de amônia foram maiores que 0,5 Kg NH<sub>4</sub>-N.m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> e a proporção entre C/N ficou entre 1 e 2 foi necessário ajustar as concentrações de oxigênio dissolvido para 1,8 a 2,3 mg.L<sup>-1</sup>.

Ressalta-se que o oxigênio dissolvido inibe o processo anammox, mas em baixas concentrações é um inibidor reversível. Jetten *et al.* (1999) operando um reator em bateladas e introduzindo oxigênio ao sistema de forma intermitente, sendo 2 horas óxicas e 2 horas anóxicas, verificaram atividade anammox quando o reator se encontrava anóxico.

Para a efetividade da atuação dos micro-organismos anammox em sistemas biológicos é, ainda, necessário considerar alguns outros parâmetros, tais como a estratégia de alimentação minimizando acúmulo de substâncias inibidoras, as cargas de amônia aplicáveis e o tipo de reator para sucesso na retenção de biomassa.

Condições adequadas devem ser ajustadas para que também as bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia atuem em conjunto com as bactérias aeróbias oxidadoras de amônia na remoção de nitrogênio nos sistemas. Constataram-se que sistemas CANON, em bateladas alimentadas e sequenciais, foram eficientes na remoção de nitrogênio a uma taxa de 0,12 kg N.m<sup>-3</sup>dia<sup>-1</sup> quando garantidos concentrações contínuas de amônia sob baixas concentrações de oxigênio (< 0,24 mg.L<sup>-1</sup>) (Third *et al.*, 2001). Da mesma maneira, Vives *et al.* (2007), demonstraram que a estratégia de alimentação ao longo de toda a fase de reação resultou em melhor estabilidade tratando chorume com concentração de amônia de 2500 mg N-NH<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>, do que a estratégia de alimentação somente no início da fase de reação.

No entanto, a combinação desses dois processos biológicos apresenta alguns inconvenientes tais como: a) devem ser conduzidos em altas temperaturas ( $\pm 35^{\circ}\text{C}$ ) e, assim, consequente gasto de energia; b) controle das concentrações de ácido nitroso e amônia livres para evitar situações de inibição dos processos metabólicos das bactérias autotróficas no reator de nitrificação parcial e c) o crescimento lento das bactérias anammox é um importante entrave durante o período de partida dos reatores (Vives *et al.*, 2007).

Vale destacar que as temperaturas registradas nas regiões tropicais favorecem a aplicação de tecnologias de tratamento de águas residuárias por processos biológicos dependentes de temperaturas mesófilas ( $\pm 35^{\circ}\text{C}$ ) (Aiyuk *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2014).

Tem-se, também, que a eficiência da nitrificação é fortemente dependente de alcalinidade disponível. Teoricamente, o licor no sistema deve apresentar uma relação molar entre HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de aproximadamente 1,14. Vives *et al.* (2007) mostraram que a estratégia de alimentação, ao longo de toda a fase de reação em um reator de bateladas, manteve a relação molar estável e garantiu um efluente com a composição desejável de 0,77 mol de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para

1 mol de  $\text{NO}_2^-$ .

Quando se combinam vários processos num único sistema, como o caso do SNAD, os processos anammox e desnitrificação heterotrófica podem produzir alcalinidade suficiente para manter constante o pH da solução, mesmo ocorrendo o consumo pela nitrificação parcial (Wang *et al.*, 2010).

Ainda, a estratégia de alimentação pode auxiliar no controle das concentrações de várias fontes inibitórias ao processo anammox, tais como concentrações dos substratos, matéria orgânica, salinidade, metais pesados, fosfatos e sulfetos (Jin *et al.*, 2012). Jetten *et al.* (1999), apresentaram uma lista de substâncias que podem ter efeito inibidor para a atividade anammox, sendo elas: 2,4-dinitrofenol, cianeto de carbonila-clorofenilhidrazona, cloreto de mercúrio, oxigênio, fosfato e concentrações altas de nitrito.

Concentrações elevadas de nitrito, um dos substratos da reação, causam inibição da atividade anammox (Strous *et al.*, 1999b; Jetten *et al.*, 1999; Dapena-Mora *et al.*, 2004; Liang e Liu, 2008). A concentração inibitória citada por Strous *et al.* (1999b) é de 98 mg.  $\text{L}^{-1}$  de nitrito. Em reatores em bateladas sequenciais visando a desnitrificação por processo anammox operados por Vives *et al.* (2007), e de leito fixo operado Liang e Liu (2008), foram verificadas inibições do processo anammox quando o nitrito atingiu concentrações acima de 90  $\text{mg.L}^{-1}$ . Ressalta-se que o afluente ao sistema anammox deve apresentar uma relação molar entre amônia e nitrito de 1,3 (Strous *et al.* 1998).

No entanto, em um reator de *gás-lift* somente em concentrações de nitrito próximas a 200  $\text{mg.L}^{-1}$  é que ocorreu a desestabilização do processo anammox. Nesse caso, o acúmulo de nitrito foi resultado da perda de biomassa devido à sua flotação ocasionada por bolhas de gases no interior dos grânulos. A flotação da biomassa ocorreu devido à sobrecarga de nitrogênio afluente que excedeu a atividade específica anammox da biomassa (Dapena-Mora *et al.*, 2004).

A carga de amônia é, também, um parâmetro importante que influencia a estabilidade da remoção de nitrogênio por organismos anammox. Cargas de amônia superiores a 0,12  $\text{kg NH}_4.\text{m}^{-3}\text{d}^{-1}$  resultaram em diminuição na taxa de remoção de nitrogênio em um reator de leito fixo operado para favorecer o processo anammox (Liang e Liu, 2008). No entanto, em vários estudos citados em Dapena-Mora *et al.* (2004) ficou demonstrado que é possível tratar cargas de nitrogênio entre 1,0 a 2,4  $\text{kg N.m}^{-3}\text{dia}^{-1}$  pelo processo anammox.

A carga específica de nitrogênio aplicada está fortemente relacionada à concentração da biomassa no reator e ao valor máximo da atividade específica anammox ( $1 \text{ gN.g}^{-1} \text{ biomassa dia}^{-1}$ ) (Dapena-Mora *et al.*, 2004).

As bactérias anammox tem crescimento lento que é atribuído à conversão lenta do substrato, sendo  $V_{\max}$  de  $55 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  proteína. Assim, o rendimento para esse grupo foi estimado em  $0,07 \text{ mol de carbono fixado.mol}^{-1}$  de amônia oxidada (Khin e Annchhatre, 2004).

Reatores em bateladas sequenciais fornecem um bom modelo experimental para cultivar micro-organismos anammox (Strous *et al.*, 1998). Esse tipo de reator retém eficientemente a biomassa, proporciona distribuição homogênea do substrato, produtos e dos flocos da biomassa e permite otimizar condições para as bactérias anammox (Jetten *et al.*, 1999). São citados como parâmetros fisiológicos importantes ao adotar esse modelo do sistema: rendimento da biomassa, taxa máxima específica de consumo de amônia e taxa máxima de crescimento específica. Outra vantagem para a adoção dos reatores em bateladas é que há menores possibilidades de acumulação de nitrito em concentrações inibitórias ao processo anammox (Dapena-Mora *et al.*, 2004).

Em sistemas usando reatores de leito fixo, leito fluidizado e gás-lift pode-se, também, conseguir uma boa retenção de biomassa (Dapena-Mora *et al.*, 2004; Liang e Liu, 2008).

Dapena-Mora *et al.* (2004) demonstraram que a estabilidade da estrutura dos grânulos nos sistemas é um dos fatores importantes para a eficiência do processo anammox. Quanto maior a densidade dos grânulos, maiores as forças de coesão entre as bactérias e, conseqüentemente, redução da possibilidade de acumulação de gases no interior dos grânulos, redução de lise celular e, ainda, redução das perdas de substratos intermediários importantes para os micro-organismos anammox.

Mediante o conjunto de parâmetros operacionais e condições físico-químicas apresentados que permitem o desenvolvimento dos micro-organismos anammox e que possibilitam a combinação com outras bactérias consorciadas do ciclo do nitrogênio tem-se os seguintes exemplos.

Wang *et al.* (2010), definiram condições para ocorrência simultânea dos processos nitrificação parcial, anammox e desnitrificação em um único sistema em tanques aerados, escala plena,



tratando chorume. As condições usadas para ocorrência conjunta desses processos biológicos foram: 1,6 dias de tempo de detenção hidráulica; 12 a 18 dias de retenção de lodo; concentrações de 2110 e 1505 mg.L<sup>-1</sup> de sólidos suspensos totais e voláteis, respectivamente; concentração de oxigênio dissolvido em 0,3 mg.L<sup>-1</sup>, pH mantido em torno de 7,4 e temperatura oscilando entre 30 e 33°C. As concentrações médias afluentes de carbono orgânico e amônia foram de 554 e 634 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados de eficiência de remoção de carbono orgânico e amônia foram de 28% e 80%, respectivamente (Wang *et al.*, 2010).

A remoção de nitrogênio pelo processo SNAD também foi obtida usando um RBS tratando água residuária sintética (Lan *et al.*, 2011). As condições usadas foram temperatura a 35°C, pH entre 7 e 8, concentração de oxigênio dissolvido entre 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, alcalinidade de 250-300 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. O diferencial nesse trabalho foi avaliar o tempo de detenção hidráulica necessária para remover amônia e carbono em concentrações de 200 mg.L<sup>-1</sup> e 100 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A remoção de 96% de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e de 86% de COD foi obtida quando as cargas aplicadas foram de 44 gN.m<sup>-3</sup>dia<sup>-1</sup> e 22 gC.m<sup>-3</sup>dia<sup>-1</sup> equivalendo a período de detenção hidráulica de 4,5 dias.

### **3.5 - DETECÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS**

Até poucas décadas, as técnicas microbiológicas convencionais foram as únicas ferramentas possíveis para investigação das comunidades microbianas. Estas baseavam-se na obtenção de culturas puras a partir de meios seletivos e de enriquecimento. No entanto, a falta de informações sobre fisiologias, interações simbióticas e sintróficas dificultavam a obtenção de culturas *in vitro* (Sanz e Kochling, 2006). Acredita-se que, na maioria absoluta (99%), as células dos micro-organismos de amostras ambientais não sejam recuperadas em cultura puras usando metodologias de plaqueamento e por estimativas do número mais provável (Gao *et al.*, 2011; Youssef *et al.*, 2014).

A aplicação das técnicas de biologia molecular para o conhecimento das comunidades biológicas de reatores para tratamento de águas residuárias tem auxiliado no entendimento dos vários processos biológicos (Sanz e Kochling, 2006; Sánchez *et al.*, 2014).

A abordagem baseada nos genes que codificam o RNAr 16S tem sido amplamente adotada pela comunidade científica e utilizada para estudos de diversidade microbiana por meio da sistemática de micro-organismos (Krieg *et al.*, 2011; Ludwig *et al.*, 2011; Yossef *et al.*, 2014). O RNAr 16S é uma molécula encontrada na pequena subunidade ribossomal dos procariotos e é considerada um cronômetro evolutivo, pois foi altamente conservada ao longo da evolução, apresenta regiões extremamente variáveis e está presente abundantemente em todos os seres vivos (Madigan *et al.*, 2010). Mais recentemente, os genes que codificam o espaço intergênico e o RNAr 23S têm sido também adotados nos estudos (Jetten *et al.*, 2011).

Tem-se, ainda, utilizados genes específicos, ou seja, que codificam proteínas enzimáticas únicas e específicas para cada grupo de organismos. De acordo com Hirsch *et al.* (2011), o uso das ferramentas moleculares, tendo como alvo os genes funcionais, têm aumentando a detecção e compreensão da diversidade microbiológica envolvendo o ciclo do nitrogênio.

As principais técnicas moleculares atualmente utilizadas para estudar os micro-organismos em sistemas de tratamento de águas residuárias são Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) convencional e quantitativa, Eletroforese em Gradiente de Gel Desnaturante (DGGE), Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), Clonagem e Sequenciamento dos genes (Sanz e Kochling, 2006).

Os estudos com resultados mais consistentes baseiam-se no uso combinado das várias técnicas de biologia molecular. Em estudos de comunidades microbianas advindas de estações de tratamento de águas residuárias, a técnica de DGGE tem sido aplicada em conjunto com hibridização fluorescente *in situ* (FISH) que, além de confirmar a presença de determinado grupo detectado pelo DGGE, permite uma análise quantitativa (Sanz e Kochling, 2006). Os estudos tratando dos micro-organismos relacionados ao ciclo do nitrogênio têm adotado as técnicas moleculares disponíveis como segue.

Araújo *et al.* (2010), utilizaram as técnicas moleculares de PCR e FISH para identificar e quantificar a biomassa de um reator operado em bateladas sequenciais com meio sintético visando a atividade anammox.

Martins (2007) utilizou-se de DGGE para avaliar mudanças na estrutura dos consórcios presentes em quimiostatos operados para enriquecimento de bactérias anammox e com a técnica de FISH confirmou a presença desses organismos nos consórcios microbianos.

Wang *et al.* (2010), usando *primers* e sondas específicas para grupos anammox utilizaram-se das técnicas de PCR e FISH, com a finalidade de avaliar a presença desse grupo em tanques de aeração onde os processos de nitrificação parcial, anammox e desnitrificação ocorriam concomitantemente.

O uso de PCR quantitativa vem ganhando destaque nas avaliações de sistemas de tratamento visando processos de remoção de nitrogênio. Hu *et al.* (2010) identificaram e quantificaram bactérias anammox em oito reatores para remoção de nitrogênio. Esses autores avaliaram a diversidade e abundância de bactérias anammox observando-se configuração de reatores, idade do lodo e fonte dos inóculos usando as técnicas de análise de PCR quantitativa e FISH. Outra vantagem da PCR quantitativa é permitir acompanhar o aumento do número de cópias de DNA dos genes de interesse ao longo do tempo em sistemas biológicos e, com isso, ter uma eficiente metodologia para estimar o tempo de duplicação de bactérias (Tsushima *et al.*, 2007a; Bae *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010).

Bae *et al.* (2010) usaram clonagem e sequenciamento do gene para o RNAr 16S para construção de árvores filogenéticas avaliando a diversidade de clones relacionados ao Filo Planctomycetes em 5 inóculos diferentes visando partidas de reatores anammox, tendo sido registradas uma variedade de unidades taxonômicas operacionais (OTU) nos inóculos testados, indicando grande diversidade principalmente para aqueles inóculos provenientes de sistemas ambientais anaeróbios e anóxicos tratando águas residuárias ricas em nitrogênio. A técnica PCR quantitativa foi também utilizada para avaliação dos enriquecimentos visando atividade anammox. Park *et al.* (2010) utilizaram-se das técnicas de PCR quantitativa, PCR convencional e DGGE para avaliarem o impacto dos tipos de inóculos nas taxas de crescimento dos micro-organismos, na velocidade de utilização dos substratos, no efeito das condições de operação em comunidades anammox em biorreatores.

Os iniciadores ou *primers*, utilizados nas técnicas moleculares, para a detecção de bactérias aeróbias e anaeróbias oxidadoras de amônia são baseados no gene de RNAr 16S e/ou em genes específicos como *amoA*, que codificam a subunidade catalítica  $\alpha$  da enzima amônia monoxigenase (Li *et al.*, 2010) e para o gene *hzo*, responsável pela enzima que sintetiza a hidrazina, molécula indicadora da atividade das bactérias anammox (Hirsh *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 2008).

Jetten *et al.* (2005) recomendam o uso das técnicas moleculares, tal como o PCR e FISH,

específicos para a ordem Brocadiales na análise ambiental de habitats em que potencialmente ocorre o processo anammox. Dessa forma, alguns estudos utilizam-se das técnicas de biologia molecular para realizarem varreduras de sistemas ambientais naturais e antropizados como as estações de tratamentos de esgotos domésticos e efluentes agroindustriais ricos em cargas de nitrogênio, procurando pelos micro-organismos anammox, visando indicar biomassas para partidas mais rápidas de sistemas anammox (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010; Costa, 2013a).

A técnica de FISH tem sido muito utilizada na obtenção de dados qualitativos e quantitativos de bactérias anammox em amostras ambientais (Schmid *et al.*, 2005). A sonda S-P-Planc-0046-a-A-18 (Pla46) que hibridiza com o gene do RNAr 16S é muito recomendada para experimentos iniciais visando a identificação e quantificação da maioria dos Planctomicetales, hibridizando também com o grupo Brocadiales (Jetten *et al.*, 2011). A sonda S-D-Bact-0338-d-A-18 é indicada para identificar o gene RNAr 16S de *Isosphaera* que não é detectável com a sonda Pla46 (Schmid *et al.*, 2005).

É importante selecionar e combinar *primers* específicos para esses micro-organismos a fim de comparações e construções de árvores filogenéticas. Existem alguns *primers* que oferecem uma boa resposta na amplificação dos micro-organismos anammox e a combinação de alguns oferece uma boa especificidade para determinados grupos de organismos anammox (Schmid *et al.*, 2005). Os *primers* mais utilizados para a amplificação dos genes baseados no RNAr 16S por meio da técnica de PCR são apresentados na Tabela 3.6. Inicialmente a maior parte dos *primers* foram desenhados visando “*Candidatus* Brocadia anammoxidans”, mas registrou-se o iniciador S-\*-Amx-820-a-A-22 (Amx820) hibridizando com “*Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis” (Jetten *et al.*, 2011).

É muito efetiva a combinação do *primer* S-P-Planc-0046-a-A-18 (direto) com o *primer* reverso S-\*-Amx-0368-a-A-18 para detecção da maioria dos micro-organismos anammox conhecidos (Schmid *et al.*, 2005; Jetten *et al.*, 2011). Foi com o uso desses *primers* que Sánchez-Melsió *et al.* (2009) confirmaram a presença de “*Ca.* Brocadia anammoxidans” em seis inóculos testados para enriquecimento anammox.

Tabela 3.6: *Primers* desenhados com base nos genes para o RNAr 16S utilizados nas técnicas moleculares de amplificação do material genético dos organismos anammox.

Nome referência	Especificidade	Sequência 5'-3'
S-P-Planc-0046-a-A-18 (Pla46)	<i>Planctomycetes</i>	GACTTGCATGCCTAATCC
S-P-Planc-0886-a-A-19 (Pla886)	<i>Isosphaera, Gemmata, Pirellula, Planctomyces</i>	GCCTTGCAGACCATACTCCC
S-D-Bact-0338-b-A-18 (Eub3381I)	Linhagens de bactérias não abrangidas pelas sondas EUB338 e EUB3381Ia	GCAGCCACCCGTAGGTGT
S-D-Bact-0338-d-A-18 (Eub3381V)	Linhagens de bactérias não abrangidas pelas sondas EUB338 e EUB3381Ia e EUB111	GCAGCCTCCCGTAGGAGT
S-*-Amx-0368-a-A-18	Todos os organismos anammox	CCTTTCGGGCATTGCGAA
L-*-Amx-1900-a-A-21	Gênero “ <i>Ca. Brocadia</i> ” e “ <i>Ca. Kuenenia</i> ”	CATCTCCGGCTTGAACAA
S-*-Amx-0820-a-A-22 (Amx820)	Gênero “ <i>Ca. Brocadia</i> ” e “ <i>Ca. Kuenenia</i> ”	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC
S-G-Sea-1309-a-A-21	Gênero “ <i>Ca. Scalindua</i> ”	TGGAGGCGAATTTAGCCTCC
S-*-Seabr-1114-a-A-22	“ <i>Ca. Scalindua brodae</i> ”	CCCCTGTTAACTAAAAACAAG
S-*-BS-820-a-A-22	“ <i>Ca. Scalindua wagneri</i> ” “ <i>Ca. Scalindua sorokinii</i> ”	TAATTCCTCTACTTAGTGCCC
S-S-Kst-0157-a-A-18	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	GTTCCGATTGCTCGAAAC
S-S-Kst-1275-a-A-20	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	TCGGCTTTATAGGTTTCGCA
S-S-Ban-0162(B.anam.)-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CGGTAGCCCCAATTGCTT
S-*-Amx-0156-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CGGTAGCCCCAATTGCTT
S-*-Amx-0223-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GACATTGACCCCTCTCTG
S-*-Amx-0432-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CTTAACTCCCACAGTGG
S-*-Amx-0613-a-A-22	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CCGCCATTCTCCGTTAAGCGG
S-*-Amx-0997-a-A-21	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TTTCAGGTTTCTACTTCTACC
S-*-Amx-1015-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GATACCGTTCGTCGCCCT
S-*-Amx-1154-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TCTTGACGACAGCAGTCT
S-*-Amx-1240-a-A-23	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TTTAGCATCCCTTTGTACCAACC
I-*-Ban-0071(B.anam.)-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CCCTACCACAAACCTCGT
I-*-Ban-0108(B.anam.)-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TTTGGGCCCACAATCTCA
I-*-Ban-0222(B.anam.)-a-A-19	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GCTTAGAATCTTCTGAGGG
I-*-Ban-0389(B.anam.)-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GGATCAAATTGCTACCCG
I-*-Kst-0031(K.stutt.)-a-A-18	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	ATAGAAGCCTTTGCGCG
I-*-Kst-0077(K.stutt.)-a-A-18	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	TTTGGGCCACACTCTGTT
I-*-Kst-0193(K.stutt.)-a-A-19	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	CAGACCGGACGTATAAAAAG
I-*-Kst-0288(K.stutt.)-a-A-20	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	GCGCAAAGAAATCAAAGTGG
An7F <sup>2</sup>	Todos os organismos anammox	GGCATGCAAGTCGAACGAGG
An1388R <sup>2</sup>	Todos os organismos anammox	GCTTGACGGCGGTGTG

Fonte: Schmid *et al.* (2005);<sup>2</sup> Penton *et al.* (2006)

Araújo *et al.* (2010) usaram a combinação do *primer* direto Pla46F formando par com os seguintes *primers* reversos Amx820R, Amx 1240R e Amx667R e, também, o par An7F - An1388R na técnica de PCR para detecção e confirmação da presença das bactérias anammox no lodo do inóculo proveniente de um sistema de lodos ativados e, ao longo do enriquecimento usando reator em bateladas sequenciais.

Park *et al.* (2010), fizeram uso dos *primers* Pla46F e do Amx667R desenvolvidos por van der Star *et al.* (2007), para avaliarem como o tipo de inóculo e o modo de operação interferiram na ecologia microbiana das comunidades anammox de biorreatores.

Sánchez-Melsió *et al.* (2009), melhoraram a detecção de bactérias anammox como as do grupo “*Candidatus Brocadia*” ao aumentar a especificidade do *primer*, usando o Amx368 na posição *forward* (direto) e Amx820 na posição reversa.

Na utilização de PCR quantitativa para avaliação de número de cópias relacionadas aos genes que codificam o RNAr 16S do grupo de micro-organismos anammox utiliza-se da combinação de *primers* que resultem em fragmentos mais curtos, tais como os pares Amx694F e Amx960R desenvolvidos por Ni *et al.* (2010), do Amx809F com Amx1066R e do Amx818F com Amx1066R desenvolvidos por Tsushima *et al.* (2010).

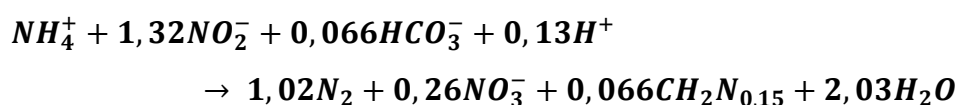
Existe, ainda, técnicas para detecção de micro-organismos não baseadas em análises moleculares, tais como microscopia, avaliação da atividade por estequiometria, pela produção de hidrazina e por verificação da mudança de coloração da biomassa.

Uma vez que as células das bactérias anammox apresentam uma morfologia irregular incomum, pode-se valer dessa característica para uma avaliação quantitativa de consórcios microbianos com anammox por meio da técnica de microscopia eletrônica. Jetten *et al.* (1999), estimaram 64% de células anammox após 177 dias em sistemas biológicos ajustados para enriquecimento anammox comparados aos 16% antes do período de enriquecimento. Wang *et al.* (2011), também, usaram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) observando a morfologia e estrutura interna da biomassa das amostras de lodos para verificação da presença de micro-organismos anammox.

Quando se têm culturas enriquecidas anammox, a biomassa apresenta-se com coloração avermelhada, devido à presença de proteínas como citocromo do tipo c que é observável no espectro visível a 468 nm (Jetten *et al.*, 1999). Assim, outra estratégia para avaliação da

atividade anammox é monitorar o aumento do sinal observado a 468 nm em espectrofotômetro à medida que um consórcio se enriquece com micro-organismos anammox.

Um mecanismo alternativo para verificar a ocorrência do processo anammox é pela avaliação estequiométrica dos reagentes e produtos nitrogenados da reação anammox, conforme a equação 3.10, desenvolvida por Strous *et al.* (1998).



Equação 3.10

Ressalta-se que todos os trabalhos que analisaram a atividade anammox, em sistemas visando esse processo para remoção de amônia, utilizaram-se da avaliação estequiométrica. Foram reunidos alguns estudos que calcularam a atividade anammox pela equivalência da estequiometria conforme proposto por Strous *et al.* (1998), sendo 1 mol de  $NH_4^+$  e 1,32 mol de  $NO_2^-$  consumidos para cada 0,26 mol de  $NO_3^-$  produzido (Tabela 3.7).

Tabela 3.7: Razão estequiométrica entre amônia, nitrito e nitrato em sistemas biológicos anammox

Sistema	Origem Inóculo	$NH_4^+$	$NO_2^-$	$NO_3^-$	Referência
Reator de gás-lift	Lodo granular anammox	1	1,28	0,26	Dapena-Mora <i>et al.</i> , 2004
Reator bateladas	Lodo granular anammox	1	1,11	0,20	
Culturas bateladas	Discos rotativos submersos	1	1,38	0,29	Tsushima <i>et al.</i> , 2007
Culturas bateladas	SBR aeróbio	1	0,91	0,45	Bae <i>et al.</i> , 2010
	Reator anaeróbio	1	0,77	0,31	
	Reator anóxico	1	0,80	0,30	
	Discos rotativos	1	1,04	0,13	
Biorreatores com membranas em diferentes concentrações de biomassa	Reator anóxico	1	1,32	0,37	Tao <i>et al.</i> , 2013
		1	1,62	0,44	
		1	1,37	0,26	

Para a detecção da atividade anammox pode-se também utilizar amônia e nitrito com isótopo do nitrogênio marcado ( $^{15}\text{N}$ ) (Schmid *et al.*, 2005). Assim foi utilizado  $\text{NaNO}_2$  com  $^{15}\text{N}$  para verificar a diferença entre a produção percentual de gás  $\text{N}_2$  pelas combinações  $^{14-14}\text{N}_2$ ;  $^{15-15}\text{N}_2$  e a  $^{14-15}\text{N}_2$  que é atribuída à atividade anammox (Tsushima *et al.*, 2007a).

As bactérias anammox apresentam um grupo de lipídeo único, devido à cadeia *ladderane*, que pode ser usado como um biomarcador indicando a presença de células anammox numa amostra, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009).

A avaliação da conversão de hidroxilamina em hidrazina, por meio de suas concentrações, pode ser utilizada para detecção de organismos anammox, pois são os únicos organismos a catalisar essa reação (Schmid *et al.*, 2005; Suneeth e Joseph, 2011).



## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Com a finalidade de responder aos objetivos propostos neste trabalho de doutorado, segue-se o detalhamento do desenho experimental, com os materiais utilizados, as descrições das etapas experimentais, as metodologias analíticas físico-químicas e de biologia molecular, o tratamento dos dados brutos obtidos e os testes estatísticos utilizados para verificação dos processos biológicos ocorrentes nos sistemas biológicos estudados.

Os experimentos e as análises dos parâmetros físico-químicos e PCRq (Reação em Cadeia de Polimerase por avaliação e quantificação em tempo real) foram desenvolvidos no Laboratório de Análise de Água (LAA) do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília. As análises de biologia molecular por PCR convencional foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília em parceria com a Profa. Dra. Cynthia Maria Kyaw. A determinação das sequências de nucleotídeos (sequenciamento), dos fragmentos amplificados por PCR, foi obtida pela contratação do serviço *EZ-Seq* da Macrogen na Coreia do Sul.

O estudo iniciou-se com a concepção e desenvolvimento dos reatores utilizados e com a definição e coleta dos lodos de sistemas ambientais, posteriormente inoculados nos sistemas biológicos desse estudo. Após a montagem dos sistemas biológicos, o trabalho experimental foi dividido em 2 etapas, sendo elas: desenvolvimento da biomassa visando enriquecimento de micro-organismos responsáveis pelo processo anammox e avaliação do comportamento de conversão dos compostos nitrogenados, estabelecidas as condições de operação dos sistemas biológicos (Figura 4.1).

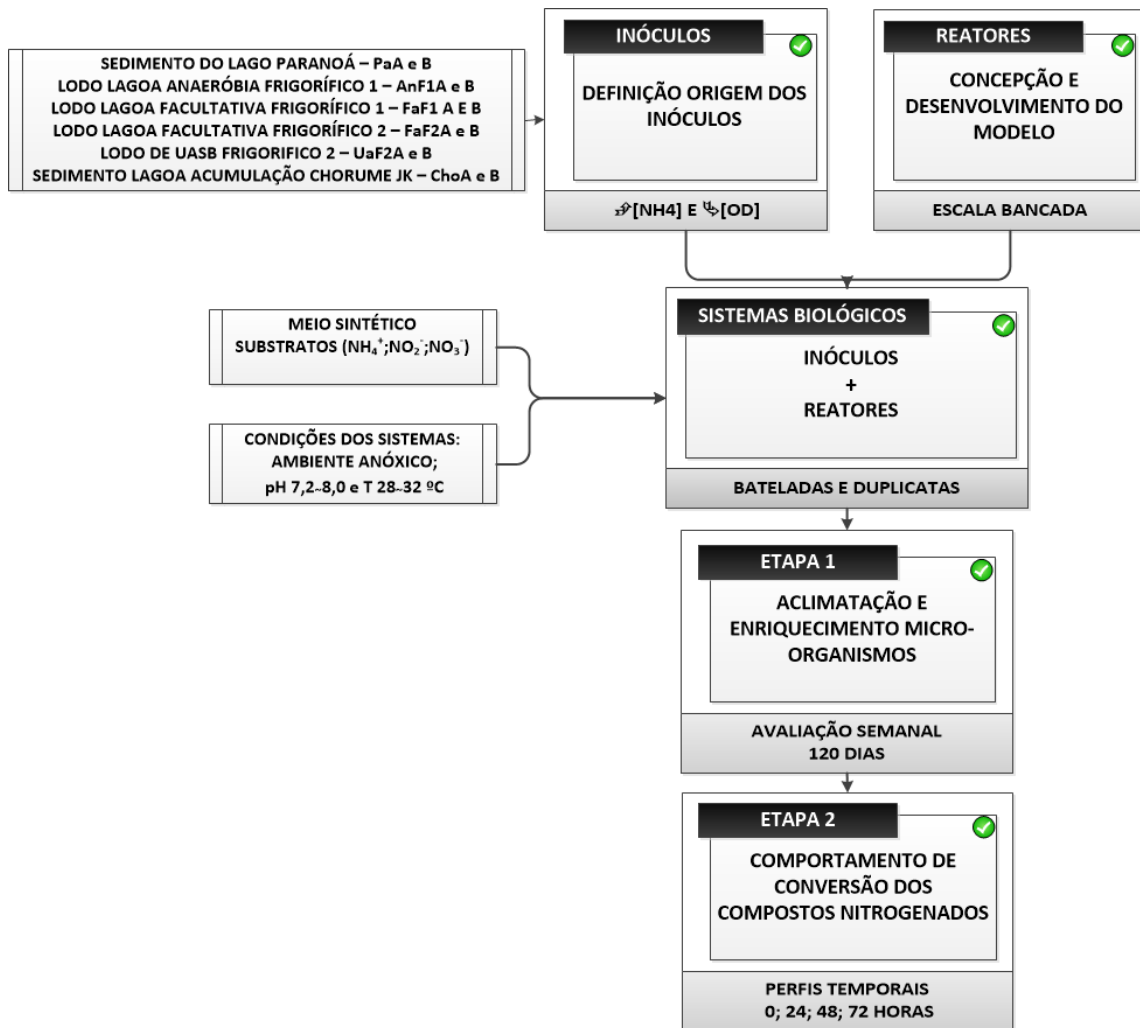


Figura 4.1: Desenho experimental do trabalho.

## 4.1 - DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS

### 4.1.1 - Reatores: Concepção e Desenvolvimento

Para maior controle dos processos biológicos concebeu-se um sistema de reatores, em escala de bancada, para serem operados em bateladas sequenciais.

Foram projetados reatores buscando-se conseguir um sistema estável onde as condições anaeróbias fossem predominantes. Os reatores foram desenvolvidos usando tubos de acrílico de diâmetro interno de 90 mm e parede com espessura de 5 mm, com volume total de 1600 mL, capazes de resistir a uma pressão de 2,24 Kgf.cm<sup>-2</sup> (Figura 4.2A) (Tubos DE 100 mm; DI 90 mm; Parede 5 mm; Comprimento 200 mm, Acrílicos Brasil Ltda., BR).

A capacidade útil (1000 mL) dos reatores foi determinada pela estimativa do número e volume de alíquotas do licor misto necessárias à condução das análises físico-químicas durante a fase de avaliação dos perfis temporais, de modo a remover, ao final de cada batelada, no máximo 10% do volume do sistema, minimizando modificações das concentrações de substratos por redução do volume do sistema.

Foram confeccionados 24 reatores para funcionarem num sistema composto por 2 peças, sendo um responsável por conter a mistura biomassa e água residuária sintética, e o outro para conter água para dissolução dos gases formados no primeiro reator e para avaliar a produção de gases pelo deslocamento da massa de água, conforme proposto por Suneethi e Joseph (2011) (Figura 4.2B).

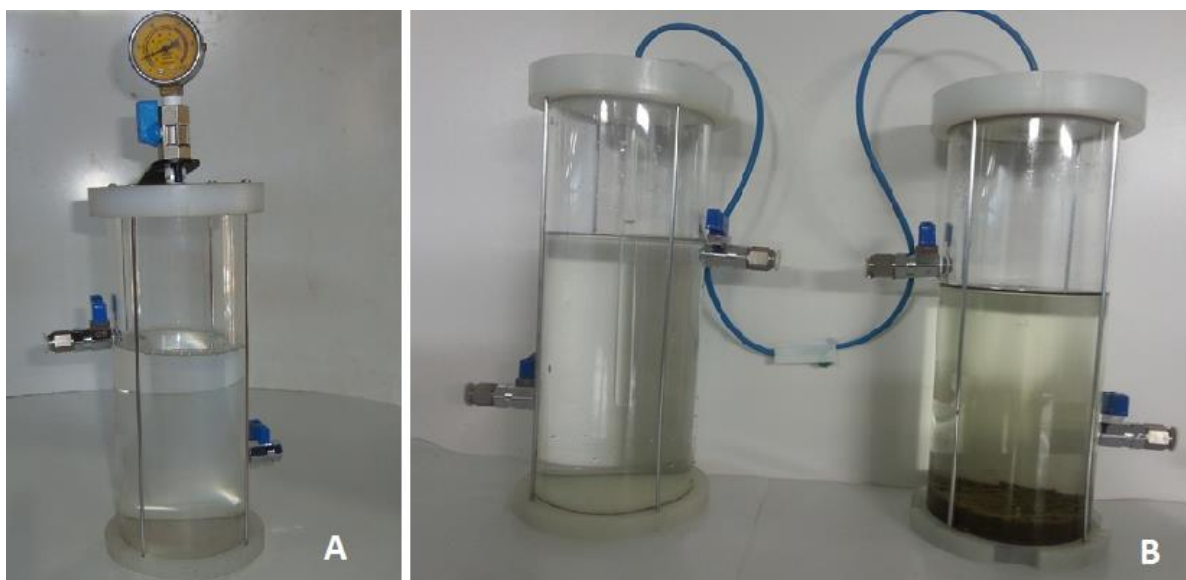


Figura 4.2: A) reator desenvolvido para estabelecimento dos sistemas biológicos B) sistema composto por dois reatores (1: com água para dissolução de gases e 2: biomassa, meio sintético e substratos nitrogenados)

Os reatores projetados possuíam sistemas de entrada para alimentação e descarte dos efluentes por válvulas de esfera 1/8" npt (GE, Brasil), com acoplamento de conexão de engate rápido 1/8" (Pro-S, Brasil), localizadas nas paredes laterais dos reatores facilitando o manuseio dos mesmos e, assim, diminuindo o tempo de perturbações aos sistemas. As tampas inferiores e superiores foram moldadas em tarugos de nylon, com mecanismos de suporte para oringes e encaixes de aperto, garantindo vedação aos sistemas (Figura 4.3 A,

B). Na tampa superior foi instalado um adaptador de rosca 1/4" com engate rápido de 2,5 mm (4-5/32", Pro-S, Brasil) para remoção dos gases produzidos pelo metabolismo dos micro-organismos (Figura 4.3 C).

Nos reatores com 25,2 cm de altura, a válvula de descarte na lateral do sistema foi instalada a 5,6 cm da base do reator mantendo-se um volume de 350 ml dentro do sistema e, assim, a conservação da biomassa no sistema após a sedimentação do licor misto. A válvula de alimentação foi instalada a 15,7 cm da base do reator para permitir a introdução do meio sintético acrescido dos substratos e realizar a troca volumétrica de 65% (4.3 A).

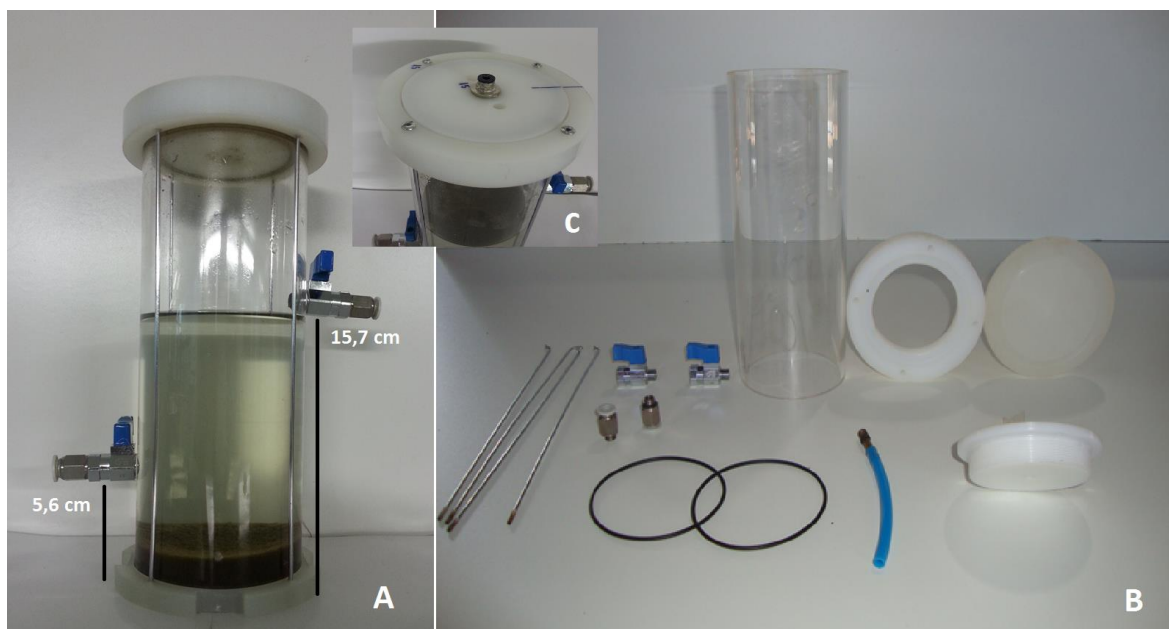


Figura 4.3: A) Localização das válvulas de alimentação e descarte dos reatores; B) Componentes utilizados na produção dos reatores; C) Válvula para escape dos gases produzidos nos sistemas biológicos.

Nas peças utilizadas para reter os gases produzidos nos sistemas biológicos foi encaixado um tubo de acrílico (canículo), com 15 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro, preso ao adaptador fixo à tampa superior. A saída desse canículo ficou submersa na água de preenchimento da peça do sistema de reatores utilizada para a dissolução dos gases (Figura 4.4 A).

A conexão entre os dois reatores, utilizados para compor os sistemas biológicos durante as fases de aclimatação, desenvolvimento e enriquecimento da biomassa, foi feita por

mangueira flexível de poliuretano (Urethane 4 GHM, Werk Schott, Brasil) com 35 cm de comprimento e diâmetro de 2,5 mm (Figura 4.4 A). Uma válvula *stopflow* foi usada na extensão da mangueira de conexão entre os dois reatores para facilitar manobras de operação (Figura 4.4 B). Mangueiras (Urethane, 8 SHM, Werk Schott, Brasil) e seringas cirúrgicas descartáveis (10 e 60 mL, com bicos de rosca e cateter) foram utilizadas para realizar as coletas de alíquotas e inserir os substratos durante os intervalos de tempo dentro das bateladas.

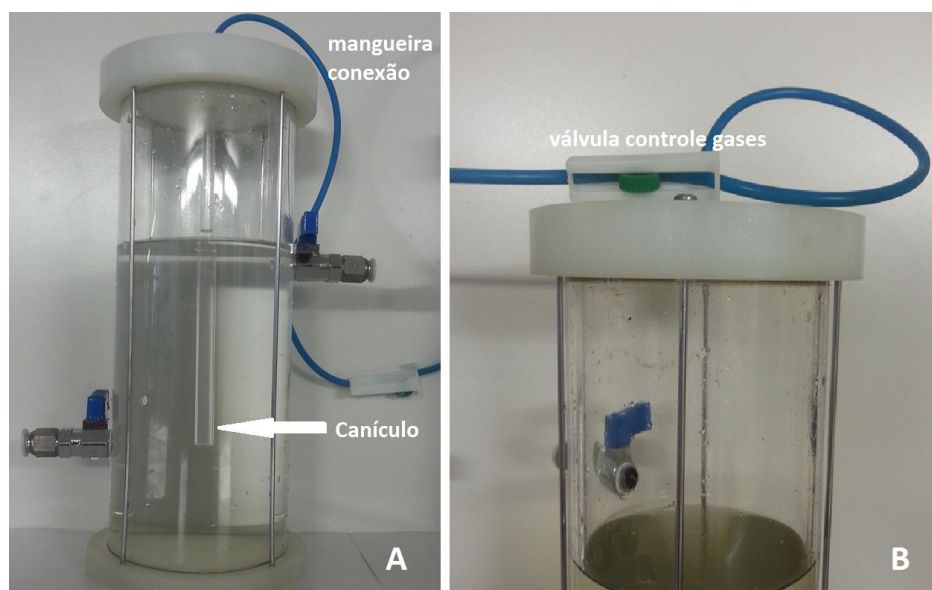


Figura 4.4: A) Reator para dissolução dos gases com canículo afogado e mangueira de conexão dos sistemas; b) válvula *stopflow* para manobras de controle durante operação dos sistemas.

#### 4.1.2 - Água Residuária Sintética e Substratos

A água residuária sintética utilizada foi a proposta por Sánchez-Melsió *et al.* (2009) que realizaram uma adaptação ao meio de Van de Graaf *et al.* (1996), conforme apresentado na Tabela 4.1. Essa água sintética apresenta características para permitir o desenvolvimento dos micro-organismos anammox tais como salinidade de 32 ppt, pH de 8,25, alcalinidade total de 580 mg.L<sup>-1</sup>, sendo alcalinidade a bicarbonato e ácidos voláteis de 530 mg.L<sup>-1</sup> e alcalinidade a ácidos orgânicos de 50 mg.L<sup>-1</sup>. A água residuária sintética não apresentou fonte de carbono orgânico e, portanto, após a fase de aclimatação dos micro-organismos nos sistemas biológicos os processos conduzidos por micro-organismos heterotróficos foram reduzidos.

A água residuária sintética foi preparada anteriormente às trocas volumétricas após a finalização de cada batelada nas duas etapas experimentais. Dessa maneira, a água residuária sintética introduzida esteve sempre com as suas propriedades químicas conservadas.

A solução de elementos traços, importante para o pleno metabolismo dos micro-organismos, foi a proposta por Van de Graaf *et al.* (1996), que a desenvolveu para o enriquecimento de micro-organismos anammox (Tabela 4.1). A solução estoque de elementos traços foi preparada no volume de 1 L e mantida sob armazenamento a 4 °C sendo substituída à medida que se esgotava. Utilizou-se água ultrapura para preparação da água residuária sintética e para a solução estoque de elementos traços (Gradient Milli-Q, Millipore, DE).

O oxigênio dissolvido presente no meio sintético foi removido por deslocamento com nitrogênio gasoso conforme metodologia proposta por Wang *et al.* (2011) e com o uso de uma sonda de OD, a remoção do oxigênio foi acompanhada até que o visor do equipamento indicasse uma concentração máxima de 0,03 mg.L<sup>-1</sup> de OD (55 DO - 12 FT, YSI Incorporated, USA).

Tabela 4.1: Soluções de macro e micronutrientes da água residuária sintética utilizada nas etapas experimentais.

ÁGUA RESIDUÁRIA SINTÉTICA (pH: 7,2 a 7,4) <sup>1</sup>		SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS <sup>2</sup>	
Substâncias <sup>3</sup>	Quantidade (mg.L <sup>-1</sup> )	Substâncias <sup>3</sup>	Quantidade (mg.L <sup>-1</sup> )
NaHCO <sub>3</sub>	1050	EDTA	15000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	430
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	300	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	240
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	165	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	990
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	12	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	250
EDTA.2H <sub>2</sub> O	7	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	220
Solução de elementos traços	1,25 ml.L <sup>-1</sup>	NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	190
		Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	90
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	14

Fonte: <sup>1</sup>Sánchez-Melsió *et al.* (2009) e <sup>2</sup>Van de Graaf *et al.* (1996). <sup>3</sup>Reagentes químicos, grau analítico PA.

Os substratos nitrogenados utilizados foram amônia ( $\text{NH}_4^+$ ); nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), e para tanto foram preparadas soluções concentradas de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  $\text{NaNO}_2$  e  $\text{NaNO}_3$  com  $5000 \text{ mg.L}^{-1}$  dos íons de interesse (Tabela 4.2). Devido à instabilidade das formas nitrogenadas em solução, as soluções concentradas com os substratos utilizados nas etapas experimentais foram preparadas anteriormente à introdução nos sistemas a cada batelada, para evitar ocorrência de oxidações externas aos sistemas biológicos. As soluções foram preparadas com água ultrapura (Gradient Milli-Q, Millipore, DE).

Tabela 4.2: Soluções com os substratos utilizadas nas etapas experimentais.

<b>SOLUÇÕES COM OS SUBSTRATOS NITROGENADOS</b>		
<b>Substância<sup>1</sup></b>	<b>Quantidade composto químico em <math>\text{g.L}^{-1}</math></b>	<b>Quantidade íon interesse Em <math>\text{g.L}^{-1}</math></b>
$\text{NH}_4\text{Cl}$	14,8	5
$\text{NaNO}_2$	7,51	5
$\text{NaNO}_3$	6,85	5

<sup>1</sup> Reagentes químicos com grau Analítico PA.

Soluções de  $\text{HCl}$ ,  $\text{NaOH}$  e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1M foram preparadas para ajuste do pH dos sistemas biológicos dentro da faixa das condições ambientais estabelecidas nas etapas experimentais.

#### **4.1.3 - Fonte dos Inóculos**

Para verificar a presença de micro-organismos e atividade anammox nos inóculos escolhidos, procurou-se obtê-los a partir de locais propícios ao seu desenvolvimento. As interfaces óxicas/anóxicas de muitos sedimentos naturais e ambiente antropizados mostraram-se como habitats ideais para os micro-organismos oxidadores anaeróbios de amônia (Jetten *et al.*, 1999; Kartal *et al.*, 2012).

Desta forma, buscou-se inóculos a partir de:

#### **a) Sedimento do Lago Paranoá, Brasília:**

O Lago Paranoá formado a partir do barramento do rio Paranoá no ano de 1959, também represou as vazões de várias micro bacias contribuintes sendo as águas do Riacho Fundo, Ribeirão do Gama, Ribeirão do Torto, Ribeirão Banana e dos córregos Acampamento, Taquari, e Ribeirão Cabeça de Veado (Liporoni, 2012). Apresenta uma extensão superficial de 38 Km<sup>2</sup> com um volume de 441x10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>, com uma profundidade máxima de 38 m junto à barragem e média de 12,42 m, com tempo de detenção hidráulica de 299 dias (CAESB, 2003; CEB, 2010).

O lago Paranoá recebe várias descargas de poluição com concentrações de nitrogênio oriundas de fontes pontuais e difusas. Como exemplos de fontes pontuais tem-se as contribuições de esgotos sanitários da população urbana do DF proveniente de três Estações de Tratamento de Esgoto da CAESB (Companhia de Água e Esgoto de Brasília) Norte, Sul e Riacho Fundo, no entanto todas as estações possuem, desde 1994, a etapa de tratamento terciário para remoção de nutrientes como o nitrogênio e o fósforo (CAESB, 2003). Tem-se, também, o escoamento superficial das bacias urbanas da cidade de Brasília como importantes fontes difusas contribuindo com o aporte de nutrientes para o Lago Paranoá (Costa, 2013b; Souza, 2014). Ainda assim, o Lago Paranoá é considerado Oligotrófico (Philomeno, 2007; GDF, 2012a; GDF, 2012b).

As amostras de sedimento do lago Paranoá foram coletadas durante o desenvolvimento do projeto Águas - Pro Centro Oeste e foram armazenadas a 4°C, no Laboratório de Análise de Águas da UnB. A biomassa inoculada nos sistemas biológicos foi resultante da composição de amostras de sedimentos de 3 pontos de coleta no lago Paranoá localizados próximos à ponte do Bragueto, à Estação de Tratamento de Esgoto Norte (ETE Norte, CAESB) e à ponte Juscelino Kubitschek.

#### **b) Lodos de sistemas de tratamento de efluentes de abatedouros de suínos e bovinos nos municípios de Uberlândia e Araguari, Minas Gerais:**

A escolha desse tipo de ecossistema deve-se ao fato dos mesmos reunirem várias condições que os qualificam como habitats propícios ao desenvolvimento de micro-organismos anammox. Isso ocorre devido às cargas de nitrogênio que esses recebem e às baixas ou nulas



concentrações de oxigênio dissolvido.

Os efluentes gerados em unidades de abate de animais e processamento de carnes caracterizam-se principalmente pela alta carga orgânica, devido à presença de sangue, gorduras, esterco, conteúdo estomacal e intestinal não digeridos; pelas flutuações de pH em função do uso de agentes de limpeza ácidos e básicos; os altos conteúdos de nitrogênio, fósforo e sais e pelas flutuações de temperatura (Pacheco & Yamanaka, 2006).

Nos abatedouros, é comum os efluentes líquidos serem divididos em duas linhas de tubulações: a linha “*verde*”, que contém os efluentes líquidos gerados em áreas sem presença de sangue (por exemplo, recepção – lavagens de pátios, caminhões, currais ou pocilgas, “seringa”, bucharia e triparia) e a linha “*vermelha*”, com os efluentes que contêm sangue (das áreas do abate e processamento das carnes). Isto é feito para facilitar e melhorar o tratamento primário (físico-químico), que é feito separadamente, permitindo remover e segregar mais e melhor os resíduos em suspensão destes efluentes, de forma a facilitar e aumentar possibilidades para sua destinação adequada (Pacheco & Yamanaka, 2006).

O sangue tem a DQO mais alta de todos os efluentes líquidos gerados no processamento de carnes. O sangue líquido bruto tem uma DQO em torno de  $400 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{DBO}_5$  de  $200 \text{ g.L}^{-1}$  e de nitrogênio de aproximadamente  $30 \text{ g.L}^{-1}$ . Dessa maneira, é comum a separação do sangue puro precedendo a estação de tratamento de efluentes com a finalidade de evitar a contribuição dessa carga ao efluente a ser tratado.

Nos abatedouros, geralmente, o tratamento secundário ocorre em lagoas de estabilização, especialmente as anaeróbias. Há, também, outras possibilidades de processos biológicos anaeróbios, citando-se: processos anaeróbios de contato, filtros anaeróbios e digestores anaeróbios de fluxo ascendente. Com relação a processos biológicos aeróbios, podem-se ter processos aeróbios com biofilme (filtros biológicos e biodiscos) e processos aeróbios de biomassa dispersa (lodos ativados convencionais e de aeração prolongada, que inclui os valos de oxidação). Também é bastante comum observar o uso de lagoas fotossintéticas na sequência do tratamento com lagoas anaeróbias (Pacheco & Yamanaka, 2006).

O tratamento terciário é por vezes requerido como “polimento” final dos efluentes líquidos provenientes do tratamento secundário, promovendo remoção suplementar de sólidos, de nutrientes (nitrogênio, fósforo) e de organismos patogênicos. Podem ser utilizados sistemas associados de nitrificação-desnitrificação, filtros e sistemas biológicos ou físico-químicos

(ex.: uso de coagulantes para remoção de fósforo) (Pacheco & Yamanaka, 2006).

Assim, as lagoas de estabilização anaeróbias e facultativas presentes em abatedouros de bovinos e suínos, devido às cargas de nitrogênio que recebem e às condições de anaerobiose, possuem condições para que se estabeleçam micro-organismos anammox.

Os municípios de Uberlândia e Araguari são polos agroindustriais e possuem dezenas de abatedouros e frigoríficos registrados para processamento de carnes.

O primeiro abatedouro/frigorífico que cedeu lodos para o estudo, designado Frigorífico 1, está localizado dentro do perímetro urbano de Araguari (MGO). Esse frigorífico abate cerca de 2000 cabeças de gado.dia<sup>-1</sup>. Possui um sistema de tratamento composto por etapas primária e secundária, sendo essa última composta por lagoa anaeróbia, lagoa aerada, lagoa facultativa, sequencialmente. Escolheram-se lodos da lagoa anaeróbia e da lagoa facultativa para constituírem-se em inóculos para os sistemas biológicos.

O outro abatedouro/frigorífico, designado de Frigorífico 2, de onde foram removidos lodos para os experimentos, encontra-se localizado na zona rural de Uberlândia. Nesse abate-se cerca de 400 cabeças de gado.dia<sup>-1</sup> e 300 cabeças de suínos.dia<sup>-1</sup>. Possui um sistema de tratamento de efluente separado em linha verde e vermelha. Após todo o tratamento primário composto de gradeamento, separador de gorduras, peneiras, queimador de sangue, o efluente segue para um filtro biológico e depois para um UASB para remoção da carga orgânica. Finalmente, após o UASB, segue para uma sequência de 3 lagoas facultativas para polimento. Escolheram-se lodos do UASB e da 2ª lagoa facultativa para constituírem-se em inóculos para os sistemas biológicos.

Foi ainda coletado lodo de uma lagoa anaeróbia de um abatedouro de suínos, designado Frigorífico 3, localizado na zona rural de Uberlândia. Abate-se cerca de 400 suínos.dia<sup>-1</sup> nesse abatedouro e, o mesmo possui um sistema de tratamento dos efluentes composto por uma etapa de gradeamento e separação de gorduras e, outra etapa biológica, em lagoas anaeróbias (Figura 4.5).

Assim, foram coletadas amostras de lodos nesses três frigoríficos, observando-se as condições das lagoas e grau de tratamento pelo quais os efluentes já haviam passado.



Figura 4.5: Lagoa anaeróbia tratando efluente de abatedouro de suínos. A) vista da lagoa anaeróbia. B) Aspecto do lodo coletado no fundo da lagoa anaeróbia.

**c) Sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Club de Brasília:**

Esse sedimento caracteriza-se por acúmulo de sólidos advindos junto com o chorume das células do aterro e biomassa adaptada às condições desse ambiente. Como a concentração média de amônia no chorume é alta, espera-se que no sedimento dessa lagoa ocorra o desenvolvimento de micro-organismos anammox (Figura 4.6).



Figura 4.6: Lagoa de acumulação de chorume localizada no aterro controlado Jockey Club de Brasília, DF.

Em todos os ambientes/habitats de onde os inóculos foram coletados, à exceção do Lago Paranoá, fez-se as seguintes avaliações das variáveis ambientais, *in situ*: temperatura e pH utilizando equipamentos manuais de campo.

Para cada um dos lodos e sedimentos foi criado um código do inóculo, observando-se a origem do ponto de coleta, a etapa do tratamento, as condições *in situ* e, assim, dispostos na Tabela 4.3. Os micro-organismos, dadas as condições dos ambientes de onde se coletaram os inóculos, apresentavam metabolismo anaeróbico.

Tabela 4.3: Inóculos usados nos experimentos em batelada para enriquecimento de organismos anammox.

<b>Inóculo</b>	<b>Código Inóculo</b>	<b>Origem</b>	<b>Etapa/tipo do Tratamento</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Sedimento	<b>Par</b>	Lago Paranoá/ Brasília	-	-	-
Lodo	<b>AnF1</b>	Lagoa anaeróbia tratando efluente de frigorífico	Início/ Biológico	6,40	26
Lodo	<b>FaF1</b>	Lagoa facultativa tratando efluente de frigorífico	Final – pós lagoa aerada/ Biológico	6,85	28
Lodo	<b>FaF2</b>	Lagoa facultativa tratando efluente de frigorífico	Final – pós UASB/ Biológico	7,50	25
Lodo	<b>UaF2</b>	Reator UASB tratando efluente de frigorífico	Intermediário/ Biológico	6,76	26
Lodo	<b>AnF3</b>	Lagoa anaeróbia tratando efluente de abatedouro suíno	Intermediário/ Biológico	6,54	28
Sedimento	<b>Cho</b>	Lagoa de detenção de chorume aterro Jockey Clube	-	8,38	26

## 4.2 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.2.1 - Preparação dos Inóculos

Os diferentes inóculos foram caracterizados usando-se os parâmetros e métodos de análise apresentados na Tabela 4.4. Os inóculos foram preparados pela mistura do lodo (sólido) e sobrenadante (líquido) conforme coletados.

Tabela 4.4: Parâmetros e metodologias usadas para caracterização das diferentes amostras inoculadas nos sistemas em bateladas para enriquecimento anammox.

Parâmetro	Método*
pH	Potenciométrico
Temperatura	Potenciométrico
Sólidos Totais	Gravimétrico
Sólidos Voláteis	Gravimétrico
Sólidos Fixos	Gravimétrico
Nitrogênio Total Kjeldahl	Digestão/Espectrofotométrico
Nitrogênio amoniacal	Potenciométrico
Nitrito	Cromatografia iônica
Nitrato	Cromatografia iônica
DQO	Digestão/Espectrofotométrico

\*Referência: APHA (2005)

### 4.2.2 - ETAPA 1: Aclimação e Enriquecimento de Micro-organismos

A metodologia de culturas em bateladas foi utilizada para o processo de aclimação e desenvolvimento da biomassa, buscando-se o enriquecimento dos micro-organismos anammox, pois permite uso de sistemas simples, otimização experimental e o tempo requerido é relativamente curto (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009).

Os reatores projetados, conforme modelo apresentado no item 4.1.1, foram preenchidos cada com 25 g de lodo centrifugado dos inóculos testados ( $\approx 25$  mL) e 975 mL de água residuária sintética com os substratos nitrogenados, livre de OD, perfazendo os 1000 mL de volume reacional, e mantidos em condições anaeróbias. Os sistemas biológicos com cada lodo foram montados em duplicatas. A quantidade de lodo inserido nos reatores (25g) foi determinada visando ter uma concentração inicial de biomassa em torno de 1,5 a 2 g.L<sup>-1</sup> de sólidos

suspensos voláteis (Kuai e Verstraete, 1998; Schierholt Neto, 2007; Wang *et al.*, 2011). Os reatores foram encaixados em uma base com agitação equivalente a 100 rpm (Shaker 2540, FANEM, BR) e colocados em sala climatizada, com temperatura oscilando entre 28 a 32 °C (Figura 4.7) (HN 500 CEMAR, BR). O parâmetro pH, dentro de uma faixa de 7,2 a 8,0, foi mantido com o uso de soluções de HCl, NaOH e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1M.



Figura 4.7: Reatores inoculados com diferentes inóculos de lodos e sedimentos acoplados com os vasos para dissolução dos gases, conforme metodologia discutida no item 4.1.1, e na base agitadora em sala climatizada.

O suprimento dos substratos amônia e nitrito foi garantido pela adição das soluções de NH<sub>4</sub>Cl/NaNO<sub>2</sub> introduzidos semanalmente ao início das bateladas (Figura 4.8). O aumento das concentrações de amônia e nitrito no meio ocorreu gradativamente, iniciando com concentrações de 20 mg.L<sup>-1</sup> para ambos componentes e fazendo incrementos de 5 mg.L<sup>-1</sup> a cada batelada, até atingir a concentração de 60 mg.L<sup>-1</sup> (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009). A alimentação de cada sistema biológico foi realizada pela válvula localizada na lateral do reator posicionada a 15,7 cm da base do reator, no nível de 1000 mL (Figura 4.8).

Foi adicionado nitrato nos sistemas biológicos, em concentrações de 20 a 30 mg.L<sup>-1</sup>, nas 3 primeiras bateladas para evitar consumo de nitrito e formação de gás sulfídrico decorrentes dos processos metabólicos resultantes da presença de bactérias heterotróficas desnitrificantes e das bactérias sulfato redutoras responsáveis pela formação de gás sulfídrico. Esse procedimento também foi adotado em outros trabalhos (Tsushima *et al.*, 2007b; Sánchez-Melsió *et al.*, 2009; Suneethi e Joseph, 2011).

A água residuária sintética foi reposta periodicamente, a cada 15 dias, para evitar problemas ocasionados por acumulação ou consumo de substâncias que inibissem o desenvolvimento dos micro-organismos anammox (Tsushima *et al.*, 2007b; Sànchez-Melsió *et al.*, 2009; Suneethi e Joseph 2011). Quando da substituição da água residuária sintética, os reatores foram removidos da base agitadora e aguardou-se uma hora para deposição do lodo no fundo dos reatores abaixo do nível da válvula de descarte (350 mL) (Figura 4.8). As válvulas de descarte, localizadas na lateral dos reatores (conforme Figura 4.3), foram abertas para o descarte do meio sintético sobrenadante. Dessa forma, os reatores com capacidade útil de 1000 mL, funcionaram com 350 mL de volume mínimo, e com 650 mL de troca volumétrica, equivalendo a uma razão de troca de 65% (Figura 4.8).

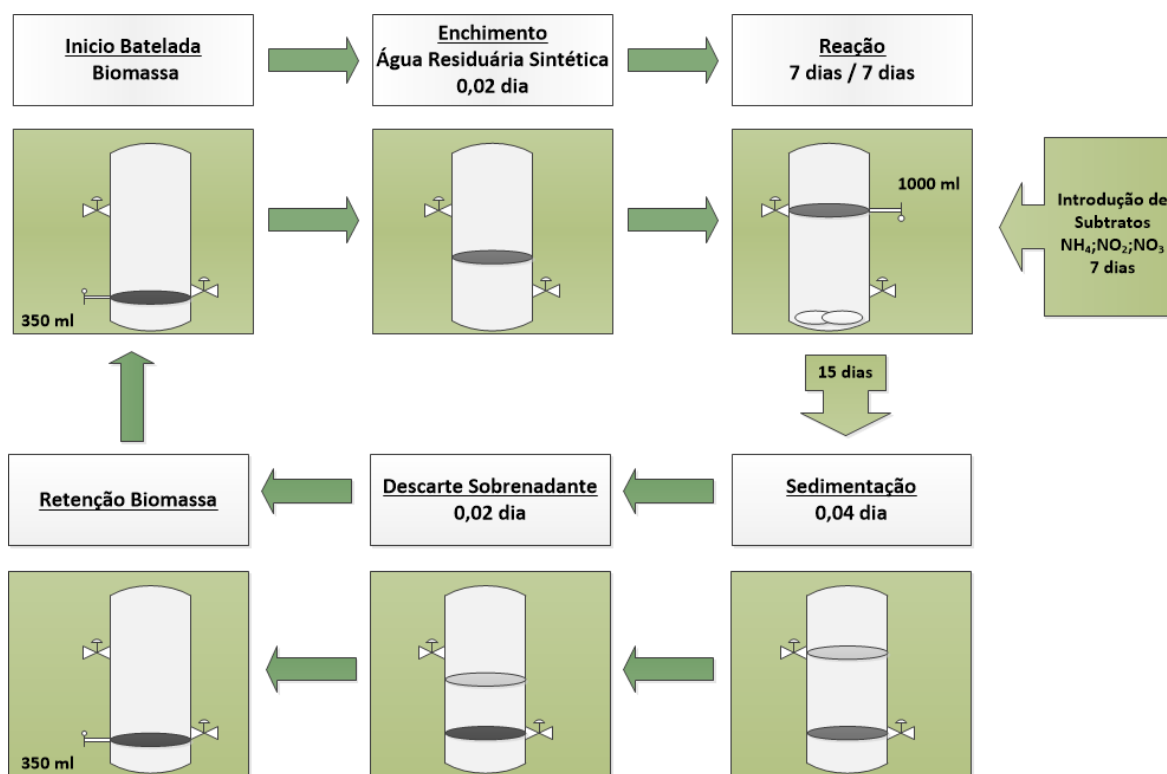


Figura 4.8: Operação dos sistemas biológicos em bateladas sequenciais na ETAPA 1, destinada à aclimatação e enriquecimento de micro-organismos anammox.

Alíquotas do licor misto (20 mL) para cada sistema biológico foram coletadas no início das bateladas (T0) (consideradas quando da inserção de novas concentrações de substratos) e após períodos compreendidos entre 5 e 7 dias (T1) para avaliar as conversões de amônia,

nitrito e nitrato, bem como dos íons aniônicos fosfato e sulfato presentes no meio. O pH do licor misto, quando das retiradas das alíquotas, foi acompanhado e ajustado quando necessário para a faixa de 7,2 a 8,0.

Na parte superior do reator, uma válvula fez o controle de escape dos gases produzidos que foram capturados por dissolução em água destilada, para quantificação dos gases produzidos medidos pelo deslocamento da massa de água, conforme proposto por Suneethi e Joseph (2011) (Figura 4.9).

Definiu-se uma metodologia para equilibrar os sistemas compostos pelos reatores como as diferentes biomassas e água residuária sintética (P2) com seus respectivos reatores para recepção dos gases (P1) e assim quantificar o volume dos gases produzidos por cada sistema (Figura 4.9). Os reatores P1 e P2, com *headspace* à pressão atmosférica, foram conectados e, após a válvula de descarte do reator P1 foi aberta expulsando cerca de 8 ml de água e cessando a vazão pois o sistema entrava em equilíbrio. Qualquer novo deslocamento de água a partir do reator P1 só ocorreu devido à introdução e ou formação de gases no sistema. Dessa maneira, foi possível encontrar uma equivalência entre os gases produzidos em P2 e o deslocamento de água em P1. Assim, um dado volume de água deslocado em P1 corresponde igual volume de gás produzido em P2.

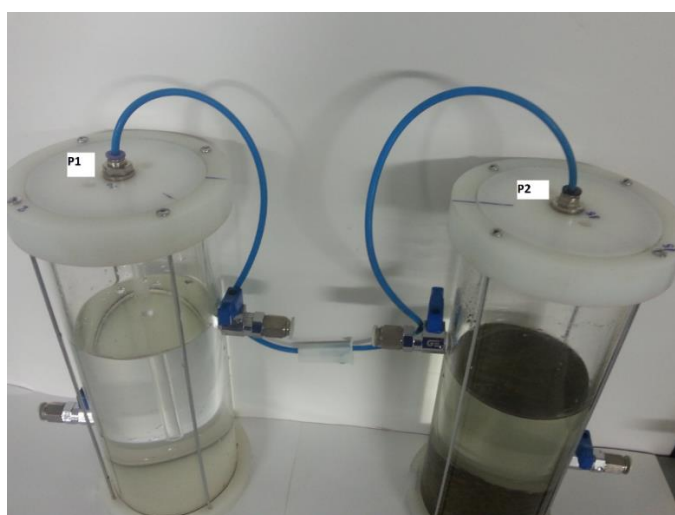


Figura 4.9: Sistema composto por duas peças para verificação e quantificação dos gases.



#### 4.2.2.1 - Coleta de biomassa para análises de biologia molecular – Etapa 1

Para detecção e quantificação dos grupos de micro-organismos relacionados ao ciclo de nitrogênio foram recolhidas alíquotas dos lodos e sedimentos antes da inoculação e do licor dos sistemas biológicos, contendo a biomassa, após 120 dias do período ajustado para o enriquecimento de micro-organismos anammox. As técnicas de biologia molecular utilizadas foram PCR convencional, PCR quantitativa e sequenciamento dos fragmentos de DNAr 16S obtidos em PCR para o grupo de micro-organismos anammox, as quais tem suas metodologias detalhadas no tópico 4.3.3 sobre Análises de biologia molecular para avaliação dos micro-organismos.

#### 4.2.3 - ETAPA 2: Comportamento de Conversão dos Compostos Nitrogenados

Para avaliação do comportamento de conversão de nitrogênio, nas formas de amônia ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nos sistemas que foram destinados ao enriquecimento e verificados atividade anammox foi desenvolvida a seguinte metodologia, adaptada da operação em bateladas sequenciais.

Os reatores com a biomassa, resultante da etapa 1, foram alimentados com o mesmo tipo de água residuária sintética acrescida com concentrações dos substratos de amônia e nitrito. Para esses ensaios foram inseridos 650 mL de água residuária sintética com concentrações crescentes de amônia e nitrito a nova cada batelada. As concentrações de amônia e nitrito iniciaram em  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $40 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente, com acréscimo crescentes de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ , até atingir concentrações de  $60 \text{ mg NH}_4.\text{L}^{-1}$  e  $80 \text{ mg NO}_2.\text{L}^{-1}$ . Dessa forma, os reatores com volume reacional de 1000 mL funcionaram com 350 mL de volume mínimo, e com 650 ml de troca volumétrica, equivalendo a uma razão de troca de 65%. Informa-se que os sistemas biológicos com cada inóculo testado encontravam-se representados em duplicatas (Figura 4.10).

Nos reatores, as condições de anaerobiose foram mantidas por remoção do oxigênio dissolvido do meio sintético por deslocamento com gás  $\text{N}_2$ , até concentrações  $< 0,04 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$  de OD. Um *headspace* de 600 mL à pressão atmosférica foi deixado em cada um dos sistemas para acúmulo dos gases gerados pelo sistema. A alimentação e o descarte do efluente proveniente das bateladas foram feitos pelas duas válvulas nas laterais dos reatores.

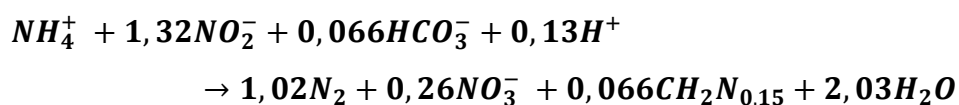
Nessa etapa não foram acompanhados os volumes dos gases produzidos.

Alíquotas com 10 mL do licor misto de cada sistema biológico foram coletadas ao longo das bateladas nos tempos T0 (zero hora); T1 (24 horas); T2 (48 horas) e T3 (72 horas) para avaliar as conversões de amônia, nitrito e formação de nitrato, bem como de outros íons aniônicos (fosfato e sulfato) presentes no meio. Para essa etapa experimental foram realizadas 10 bateladas de 72 horas para todos os sistemas testados. O pH do licor misto, quando das retiradas das alíquotas, foi monitorado para verificar as modificações do mesmo ao longo das bateladas e, portanto, não foram feitas correções de pH durante a batelada.

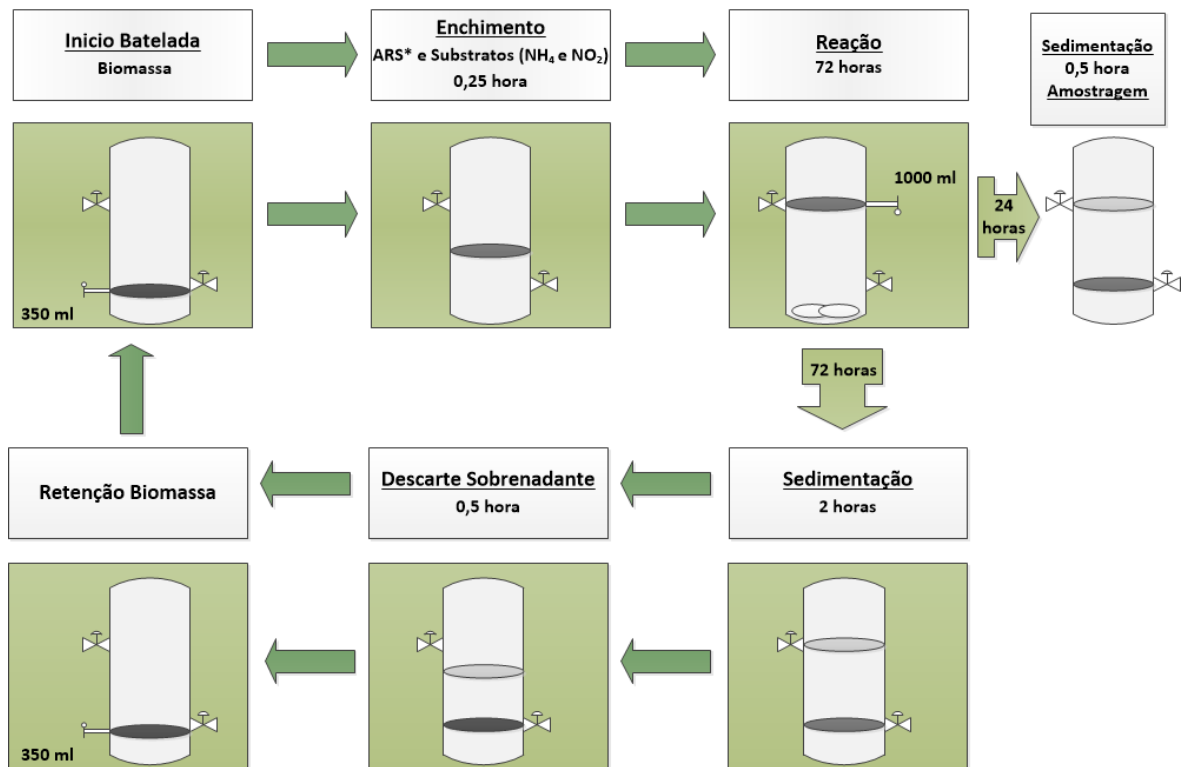
Dessa maneira, as bateladas constituíram-se em: 15 minutos para alimentação, 72 horas em reação com sedimentação de 30 minutos a cada 24 horas de reação para coleta de alíquotas do licor, 2 horas de sedimentação ao final, para permitir completa sedimentação da biomassa para realização da troca da água ressedaria sintética e reduzir a perda de biomassa (Figura 4.10).

O volume final removido para as amostragens ao longo do período de avaliação não ultrapassou 10% do volume reacional dos reatores definido em 1000 mL.

A avaliação da conversão das formas nitrogenadas foi realizada pela observação dos índices estequiométricos da reação anammox, pois os sistemas foram ajustados para que o metabolismo anammox fosse predominante nos sistemas biológicos, conforme a equação 4.1.



Equação 4.1



\*ARS = Água Residuária Sintética

Figura 4.10: Operação dos sistemas biológicos em bateladas sequencias na ETAPA 2, destinada a avaliação das conversões dos compostos nitrogenados.

#### 4.2.3.1 - Coleta de biomassa para análises de biologia molecular – Etapa 2

Para verificação e quantificação dos grupos de micro-organismos relacionados ao ciclo de nitrogênio foram recolhidas alíquotas do licor dos sistemas biológicos, contendo a biomassa, ao final dos experimentos da 2ª etapa (180 dias após a inoculação dos lodos/sedimentos nos sistemas biológicos). As técnicas de biologia molecular utilizadas foram PCR convencional, PCR quantitativa para os grupos de micro-organismos relacionados ao ciclo do nitrogênio, as quais tem suas metodologias detalhadas no tópico 4.3.3 sobre Análises de biologia molecular para avaliação dos micro-organismos.

### **4.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS**

Os métodos analíticos adotados para avaliação dos procedimentos experimentais seguiram as metodologias descritas *Standard Methods for the Examination of Water and of Wastewater* (APHA, 2005).

#### **4.3.1 - Preparação e conservação das amostras do licor misto para análises em cromatografia iônica**

As alíquotas coletadas foram imediatamente passadas em uma sequência de filtros por sistema de vácuo, iniciando pelo filtro analítico de fibra de vidro com 1 µm de poro (AP40, 47mm), membrana em ésteres de celulose (nitrato 75-80% e acetato) com 0,45 µm poro (HA, 47mm) e em membrana em éster de celulose com 0,22 µm poro (GS, 47mm) (Filtros e Membranas da Millipore Indústria e Comércio Ltda., BR).

As amostras da 1ª etapa experimental, após serem filtradas na membrana de 0,45 µm de poro, tiveram um tratamento diferenciado para redução do carbono orgânico. Esse filtrado foi colocado em contato com uma pequena quantidade de carvão ativado (10 mg por 10 mL de amostra) (Carvão Analítico PA, Merck) para adsorção do material orgânico. Essa mistura foi submetida à sonicação (Modelo USC 5000 - Ultrasonic Cleaner, Unique) durante 20 minutos para aumentar a eficiência de adsorção da matéria orgânica carbonácea ao carvão (Barbosa, 2010). Após um período de repouso as amostras foram filtradas em membranas de ésteres de celulose com 0,22 µm poro (GS, 47mm, Millipore Indústria e Comércio Ltda., BR) e separadas em triplicatas, em alíquotas de 5 mL, para posterior utilização para as análises de ânions e cátions.

As amostras das etapas 1 e 2, quando necessário, foram armazenadas em tubos com alíquotas de 5mL e estocadas sobre congelamento a -20 °C como, também, realizado por outros pesquisadores (Martins, 2007; Barbosa, 2010; Costa, 2013a; Sánchez *et al.*, 2014).

#### 4.3.2 - Análises dos componentes nitrogenados e de outros íons

A determinação das concentrações das formas nitrogenadas, sendo elas amônia ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) foi realizada por meio da cromatografia iônica, bem como dos íons aniônicos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Esses últimos íons foram também avaliados devido as colunas de separação de ânions e as soluções padrões disponíveis permitirem que os mesmos fossem quantificados. O cromatógrafo utilizado foi o ICS 900-DCR Dionex (Thermo Fisher Scientific, USA).

Na configuração do ICS 900 para análise dos ânions, utilizou-se a coluna de separação Dionex IonPac AS23 RFIC Analytical (4 x 250 mm), a coluna guarda Dionex IonPac AS23 RFIC Guard (4 x 50 mm) e a supressora Dionex AMMS 300 MicroMembrane 4 mm (Thermo Fisher Scientific, USA). O eluente utilizado na fase móvel foi a solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 4,5 mM com bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 0,8 mM. O regenerante para recuperação da supressora foi o ácido sulfúrico a 36 mM. O sistema foi operado com a condutividade da linha base a 23  $\mu\text{S}$ , velocidade do fluxo de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e pressão da bomba a  $\pm 1950$  psi, com volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$  e *loop* de amostragem de 10  $\mu\text{L}$ . O tempo de corrida para separação dos ânions foi de 22 minutos. As alíquotas foram aplicadas manualmente com utilização de seringas descartáveis de 1 mL acoplada ao filtro millex com membrana de PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (Millex, GV 13mm, Millipore Indústria e Comércio Ltda.). Para realização das curvas de padrões foi utilizado a solução de 7 Ânions da Dionex contendo os seguintes ânions fluoreto, cloreto, nitrito, brometo, nitrato, fosfato e sulfato (Dionex Seven Anion Standard II, Thermo Fisher Scientific, USA).

Na configuração do ICS 900 para análise dos cátions, utilizou-se a coluna de separação Dionex IonPac CS12A RFIC Analytical (4 x 250 mm), a coluna guarda Dionex IonPac CG12A RFIC Guard (4 x 50 mm) e a supressora Dionex CMMS 300 MicroMembrane 4 mm (Thermo Fisher Scientific, USA). O eluente da fase móvel da análise de cátions foi a solução de ácido metanossulfônico ( $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ ) a 20 mM e o regenerante do sistema de supressão foi o hidróxido de tetrabutilamônio, (TBAOH -  $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NOH}$ ) a 100 mM. O ácido metanossulfônico, ao invés do ácido sulfúrico, foi adotado como eluente porque permite uma melhor separação dos íons sódio e amônia devido a diferenciação nos tempos de detenção pela coluna de separação. O sistema foi operado com a condutividade da linha base de 2,0 a 3,0  $\mu\text{S}$ , velocidade do fluxo de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e pressão da bomba a  $\pm 1350$  psi, com volume

de injeção de 100  $\mu\text{L}$  e *loop* de amostragem de 10  $\mu\text{L}$ . O tempo de corrida para separação dos cátions foi de 14 minutos. As alíquotas foram aplicadas manualmente com utilização de seringas descartáveis de 1 mL acoplada ao filtro millex com membrana de PVDF 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (Millex, GV 13mm, Millipore Indústria e Comércio Ltda.). Para realização das curvas de padrões foi utilizado a solução de 6 cátions da Dionex contendo os seguintes íons lítio, sódio, amônia, potássio, magnésio e cálcio (Dionex Six Cation II Standard, Thermo Fisher Scientific, USA).

Todos os reagentes químicos utilizados para a preparação das soluções eluentes e regenerantes apresentaram grau de pureza PA.

A quantificação dos íons foi por meio de ajuste de variáveis (escolha dos íons, ajuste das concentrações das curvas padrões, calibração dos tempos de detecção dos picos para cada íon, calibração dos limites de quantificação de acordo com as curvas padrões e linha base, com coeficientes de correlação entre 0,965 a 0,999) do método de quantificação do programa *Chromeleon* versão 6.8 (Thermo Fisher Scientific, USA).

### **4.3.3 - Análises de biologia molecular para avaliação dos micro-organismos**

#### 4.3.3.1 - Da extração do DNA Genômico

Para avaliação da presença e quantificação dos micro-organismos de interesse nos inóculos e nas biomassas desenvolvidas nos sistemas biológicos, após a operação das etapas experimentais 1 e 2, foram feitas extrações de DNA total dos organismos presentes usando kit de extração de DNA Genômico, conforme as recomendações do fabricante (PowerSoil DNA Isolation Kit, MoBio Laboratories, Inc., USA).

A qualidade e quantidade do DNA genômico, extraído de cada amostra dos inóculos coletados nos diferentes habitats, bem como das amostras das biomassas desenvolvidas após as etapas experimentais 1 e 2, foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), usando marcador de massa molecular, *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen, USA). As estimativas das quantidades de DNA genômico das amostras dos lodos (em  $\eta\text{g}$ ) foram realizadas pela comparação da intensidade do sinal do marcador e das amostras, tendo sido padronizados das alíquotas do extrato contendo o

DNA genômico e do marcador aplicados nos géis de agarose.

#### 4.3.3.2 - Análises PCR convencional e Sequenciamento

As análises de PCR convencional foram realizadas para verificação da presença de bactérias anammox, das nitrificantes aeróbias oxidadoras de nitrito e de nitrato, utilizando pares de *primers* cujos genes alvos foram aqueles que codificam para porções do RNAr 16S e os específicos para enzima hidrazina (bactérias anammox) e hidroxilamina (bactérias aeróbias oxidadoras de amônia) (Tabela 4.5).

As condições de PCR para cada um dos pares *primers* foram estabelecidas com base em literatura, cujos pesquisadores obtiveram sucesso nas ampliações quando da utilização de DNA genômico de amostras ambientais não cultivadas. As condições para ampliações dos genes encontram-se na Tabela 4.6.

Os termocicladores utilizados para as análises de PCR foram um PTC-100 (MJ Research, Inc, USA) e PTC 1148 (MJ Mini Personal Thermal Cycler, BioRad, USA). O volume das reações em cada microtubo foi de 25  $\mu\text{L}$  contendo Tampão 1X,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, Taq Dna Polimerase 1U a 1,5U (Taq DNA Polymerase Recombinant, Invitrogen, USA), dNTPs 200  $\mu\text{M}$  (Invitrogen, USA), os *primers* 200  $\eta\text{M}$  de cada um dos pares (direto e reverso) e 10  $\mu\text{l}$  de DNA Genômico ( $0,5 \eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ). A avaliação dos fragmentos amplificados ocorreu por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), usando os marcadores para determinação dos tamanhos de fragmentos de 1Kb e 100 bp (1Kb Plus Ladder da Invitrogen, USA e 1Kb e 100 bp Dna Ladder Axigen, USA) (Figura 4.12).

Todas as ampliações foram realizadas no mínimo duas vezes, em eventos distintos de PCR. Em todas elas foram realizadas os controles negativos das reações. Por não dispor de amostras de DNA controle para os micro-organismos estudados nessa pesquisa, os controles positivos para as PCRs não foram aplicados.

Tabela 4.5: Conjunto de pares de *primers* utilizados para detecção de micro-organismos anaeróbios (anammox) e aeróbios (nitritantes e nitratantes) oxidadores de amônia.

Pares Primers	Sequência 5' -3'	Especificidade	Referência
Pla 46 F Amx820R <sup>1</sup>	GGATTAGGCATGCAAGTC AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	Planctomicetos/ <i>Ca.</i> Brocardia e Kuenenia	Neef <i>et al.</i> , 1998 Schmid <i>et al.</i> , 2000
Pla 46 F Amx 368 R <sup>1</sup>	GGATTAGGCATGCAAGTC CCTTTCGGGCATTGCGAA	Planctomicetos/Bactérias Anammox	Neef <i>et al.</i> , 1998 Schmid <i>et al.</i> , 2005
Amx 368F Amx 820R <sup>1</sup>	TTCGCAATGCCCGAAAGG AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	Planctomicetos/Bactérias Anammox	Sánchez-Melsió, <i>et al.</i> 2019
Ana-hzo1F Ana-hzo2R <sup>2</sup>	TGTGCATGGTCAATTGAAAG ACCTCTTCWGCAGGTGCAT	Detecção do gene hzoA/hzoB Anammox	Quan <i>et al.</i> , 2008
Hzoc11F1 Hzoc11R2 <sup>2</sup>	TGYAAGACYTYGCAYTGG ACTCCAGATRTGCTGACC	Detecção do gene hzoA/hzoB Anammox	Schmid <i>et al.</i> , 2008
AmoA-1F AmoA-2R <sup>1</sup>	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	Detecção do gene amoA – Bactérias aeróbias oxidadoras de amônia	Egli, 2003
NTSPA F NTSPA R <sup>1</sup>	CGCAACCCCTGCTTTTCAGT CGTTATCCTGGGCAGTCCTT	<i>Nitrospira</i> Bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito	Kindaichi <i>et al.</i> ,2006
NITRO 1198 F NITRO 1423 R <sup>1</sup>	ACCCCTAGCAAATCTCAAAAAACCG CTTCACCCAGTCGCTGACC	<i>Nitrobacter</i> Bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito	Graham <i>et al.</i> , (2007)
1055 F 1392 R <sup>1</sup>	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGGCGGTGTGAC	Universal RNAr 16S	Ferris <i>et al.</i> (1996)

Iniciadores sintetizados: <sup>1</sup>(IDT, Integrated DNA Technologies, USA) e <sup>2</sup>(Invitrogen, USA).

Tabela 4.6: Condições de amplificação utilizadas com os pares de *primers* escolhidos para detecção de micro-organismos aeróbios e anaeróbios oxidadores de amônia e nitrito.

Primers/ Referência	Condições da Amplificação (Temperatura °C e tempo)					
	D. Inicial <sup>1</sup>	Nº ciclos <sup>2</sup>	Desn. <sup>3</sup>	Anel. <sup>4</sup>	Ext. <sup>5</sup>	E.Final <sup>6</sup>
<b>Pla 46F e Amx820R</b> (Araújo <i>et al.</i> , 2011)	94 °C 4 min	35	94 °C 45 seg	56 °C 50s	72 °C 1 min	72 °C 7 min
<b>Pla 46F e Amx368R</b> (Sánchez – Melsió <i>et al.</i> , 2009)	94 °C 5 min	35	94 °C 45 seg	58 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 7 min
<b>Amx 368F e Amx 820R</b> (Sánchez – Melsió <i>et al.</i> , 2009)	94 °C 5 min	35	94 °C 45 seg	62 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 7 min
<b>Ana-hzo1F e Ana-hzo2R</b> (Quan <i>et al.</i> , 2008)	94 °C 2 min	30	94 °C 1 min	53 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 10 min
<b>Hzoc11F1 e Hzoc11R2</b> (Schmid <i>et al.</i> , 2008)	94 °C 5 min	30	94 °C 1 min	50 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 7 min
<b>AmoA-1F e AmoA-2R</b> (Egli, 2003)	95 °C 4 min	35	95 °C 1 min	60 °C 45 seg	72 °C 1 min	72 °C 3 min
<b>Ntspa F e Ntspa R</b> (Kindaichi <i>et al.</i> , 2006)	94 °C 5 min	40	94 °C 30 seg	60 °C 45 seg	72 °C 40 seg	72 °C 10 min
<b>Nitro 1198F e Nitro 1423R</b> (Graham <i>et al.</i> , 2007)	95 °C 10 min	35	95 °C 20 seg	53° C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 7 min

<sup>1</sup> Desnaturação Inicial; <sup>2</sup> Número de ciclos; <sup>3</sup> Desnaturação; <sup>4</sup> Anelamento; <sup>5</sup> Extensão; <sup>6</sup> Extensão final.



Os produtos de amplificação por PCR para os micro-organismos anammox, das amostras dos inóculos e das biomassas dos sistemas após 120 dias, usando os *primers* Pla46F e Amx 820R, foram enviados à empresa Macrogen em Seul na Coreia do Sul, para o sequenciamento dos pares de bases, contratando-se o serviço EZ-seq. A modalidade EZ-seq tratou-se da aquisição antecipada do serviço de sequenciamento junto à Empresa, na qual se obteve códigos de barra para serem afixados nos microtubos que tiveram as amostras sequenciadas. As amostras foram preparadas fazendo-se uma mistura dos produtos de PCR purificados e os *primers* utilizados nas concentrações e volumes especificados. O sequenciador utilizado foi o 3730XL (Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer, Life Technologies, USA) que se baseia na metodologia de Sanger.

Os produtos da amplificação, sendo eles fragmentos com aproximadamente 774 pb, enviados à Macrogen, foram preparados usando-se kit de purificação de DNA a partir de produtos de PCR segundo protocolo disponibilizado pelo fabricante (AxyPrep PCR *Clean up Kit*, AXIGEN, USA). Cada amostra purificada foi acondicionada em um microtubo (500  $\mu\text{L}$ ) com volume de 20  $\mu\text{l}$  ( $50\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) combinada com 10  $\mu\text{L}$  ( $5\text{ pmole}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) de cada *primer*, conforme os procedimentos recomendados para o sequenciamento de amostras a partir de produtos de PCR.

O envio das amostras de fragmentos de DNA, obtidos a partir da amplificação por PCR, à Macrogen na Coreia do Sul foi autorizado pelo IBAMA/Brasil por meio da CITES, licença de exportação e importação de material biológico (fragmentos de DNA) nº 13BR010345/DF.

Na análise de sequenciamento objetivou-se avaliar a similaridade das sequências obtidas dos produtos de PCR para genes que codificam para o RNAr 16S usando-se *primers* (Pla46F e Amx 820R) com sequências de fragmentos de micro-organismos anammox depositadas no *GenBank* (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>). Ainda que os fragmentos de DNA amplificados representem um mix dos genes para o RNAr 16S de bactérias anammox originados de células diferentes dentro da amostra ambiental, pode-se buscar o sequenciamento direto quando utilizados procedimentos e equipamentos que apresentem alto rendimento (Youssef *et al.*, 2014). Tem-se também registrado o predomínio de um único gênero anammox em amostras de sistemas biológicos em que ocorre o processo de oxidação anaeróbia de amônia (Hu *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2013) podendo-se esperar que o sequenciamento resultará na obtenção de sequências com bons padrões de qualidade para comparações filogenéticas.

A avaliação da qualidade das sequências de bases de DNA obtidas pelo sequenciamento foi analisada usando os *softwares CodonCode Aligner* versão demo 4.1.1 (CodonCode Corporation, Massachusetts, USA) e o *Sequence Scanner* versão 1.0 (Applied Biosystems, USA). As aproximações filogenéticas das sequências de DNA obtidas, para o RNAr 16S de bactérias anammox, foram realizadas por comparações com sequências de micro-organismos relacionados depositadas no *GenBank* da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando o BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*. A construção das árvores filogenéticas entre as sequências obtidas nesse estudo e as depositadas no *GenBank*, tendo-se usado as sequências de referência para as candidatas anammox, foram realizadas usando o *software Clustal Multiple Sequence Alignment* versão ômega, por análise de *bootstrap* (reamostragem) usando o método de *Neighbor-Joining* (Sierver *et al.*, 2011). No entanto, a geração das árvores filogenéticas com as relações evolutivas foi feita utilizando o programa MEGA 4.1 - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Tamura *et al.*, 2007). O dendrograma foi gerado pelo método *Neighbor-Joining* e as distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* e estão apresentadas em unidades de números de substituições de bases por sítio, sendo realizado uma estimativa simultânea dos parâmetros para todos os pares de sequências (Tamura *et al.*, 2007). As posições contendo espaços e dados faltantes nos alinhamentos foram eliminadas em comparações de sequências (por pares) usando a opção *pairwise deletion*. Análise de *bootstrap* contendo 1000 réplicas foram realizadas para estimar a confiabilidade e o arranjo das árvores.

#### 4.3.3.3 - Análises de PCR quantitativa

A análise de PCR quantitativa foi realizada para comparações relativas entre o número de cópias dos genes dos micro-organismos do Domínio *Bacteria* (Universal, Anammox, Nitritantes e Nitratantes) usando *primers* para os genes alvos RNAr 16S e o específico amoA conforme combinações propostas por Park *et al.* (2010) (Tabela 4.7). A partir da análise conjunta das biomassas antes e após cada etapa experimental foi possível realizar uma quantificação relativa para cada amostra de DNA genômico extraído para comparações entre grupos de micro-organismos dominantes em cada etapa e entre as biomassas de cada sistema (Tabela 4.8).

Tabela 4.7: *Primers* utilizados e temperatura de anelamento adotados nas análises de PCR quantitativa.

Gene Alvo	<i>Primers</i> <sup>1</sup>	Temperatura de Anelamento (°C)
Universal RNAr 16S	1055 F – 1392 R	53
Anammox RNAr 16S	Pla 46 F – Amx667 R	55
<i>Nitrobacter</i> RNAr 16S	Nitro 1198 F – Nitro 1423 R	58
<i>Nitrosomonas amoA</i>	amoA F – amoA R	57

<sup>1</sup> As sequências dos iniciadores encontram-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.8: Combinações de comparações realizadas entre as amostras de DNA genômico dos sistemas biológicos testados por análise de PCR quantitativa.

Origem do DNA Genômico	Período da extração do DNA	Grupos de micro-organismos testados			
		Universal	Anammox	<i>Nitrobacter</i>	<i>Nitrosomonas</i>
Biomassa obtida sedimento Paranoá	Pai <sup>1</sup>	✓	✓	✓	✓
	PaA e B e1 <sup>2</sup>	✓	✓	✓	✓
	PaA e B e2 <sup>3</sup>	✓	✓	✓	✓
Biomassa obtida lagoa anaeróbia Frigorífico 1	AnF1i	✓	✓	✓	✓
	AnF1A e B e1	✓	✓	✓	✓
	AnF1A e B e2	✓	✓	✓	✓
Biomassa obtida lagoa facultativa Frigorífico 1	FaF1i	✓	✓	✓	✓
	FaF1A e B e1	✓	✓	✓	✓
	FaF1A e B e2	✓	✓	✓	✓
Biomassa obtida lagoa facultativa Frigorífico 2	FaF2i	✓	✓	✓	✓
	FaF2A e B e1	✓	✓	✓	✓
	FaF2A e B e2	✓	✓	✓	✓
Biomassa obtida lagoa UASB Frigorífico 2	UaF2i	✓	✓	✓	✓
	UaF2A e B e1	✓	✓	✓	✓
	UaF2A e B e2	✓	✓	✓	✓
Biomassa obtida sedimento lagoa acumulação Chorume	Choi	✓	✓	✓	✓
	ChoA e B e1	✓	✓	✓	✓
	ChoA e B e1	✓	✓	✓	✓

<sup>1</sup>i = inicial; <sup>2</sup>e<sub>1</sub> = após etapa 1 (120 dias); <sup>3</sup>e<sub>2</sub> = após etapa 2 (180 dias)

As análises de PCR quantitativa foram realizadas usando um termociclador específico para acompanhamento das amplificações em tempo real (C1000 Touch Thermal Cycler –

BioRad, USA), com placas de 96 poços seladas (Hard-Shell 96 Well WHT/CLR e Microseal 'B' Film, BioRad, USA). Utilizou-se um mix com os reagentes necessários à amplificação dos fragmentos, contendo a enzima de polimerização (Taq), dNTPs, tampão, cloreto de magnésio e a sonda hidrolítica contendo o fluoróforo SYBR Green, para otimização das reações (SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix, BIO-RAD). O volume final das reações foi de 20 µL, sendo 10 µL do mix, 0,4 µL de cada *primer* (20 µM), 3 µL do DNA template (0,5 ng.µL<sup>-1</sup>) e água ultrapura estéril para completar o volume.

A curva de referência quantitativa foi realizada por diluições da amostra de DNA genômico extraído da biomassa a partir do sedimento do Lago Paranoá (quando da inoculação nos sistemas biológicos) com objetivo de um valor de referência (Bustin *et al.*, 2009). As diluições do DNA genômico obtido a partir da extração da biomassa presente no sedimento do Lago Paranoá (Pa inicial) utilizadas para realização das curvas foram de 0,5; 1,5; 3,75; 7,5 e 15 (ng.µL<sup>-1</sup>). Ressalta-se essa metodologia para construção da curva permite apenas uma comparação relativa e que seriam preferíveis controles positivos com DNA dos grupos de micro-organismos para construção da curva de calibração, garantindo a comparação inequívoca do número de cópias de DNA.

Na Figura 4.11 é apresentada a configuração da placa do PCR quantitativa adotada para avaliar a quantidade relativa de DNA para cada par de *primers* testados das diferentes biomassas nos diferentes tempos experimentais. Todas as amostras de DNA genômico foram aplicadas em duplicatas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 5,00E-01	Std 5,00E-01	Unk SYBR Pai	Unk SYBR Pai	Unk SYBR PaA e1	Unk SYBR PaA e1	Unk SYBR PaB e1	Unk SYBR PaB e1	Unk SYBR PaA e2	Unk SYBR PaA e2	Unk SYBR PaB e2	Unk SYBR PaB e2
B	Std 1,50E+00	Std 1,50E+00	Unk SYBR AnF1i	Unk SYBR AnF1i	Unk SYBR AnF1A e1	Unk SYBR AnF1A e1	Unk SYBR AnF1B e1	Unk SYBR AnF1B e1	Unk SYBR AnF1A e2	Unk SYBR AnF1A e2	Unk SYBR AnF1B e2	Unk SYBR AnF1B e2
C	Std 3,75E+00	Std 3,75E+00	Unk SYBR FaF1i	Unk SYBR FaF1i	Unk SYBR FaF1A e1	Unk SYBR FaF1A e1	Unk SYBR FaF1B e1	Unk SYBR FaF1B e1	Unk SYBR FaF1A e2	Unk SYBR FaF1A e2	Unk SYBR FaF1B e2	Unk SYBR FaF1B e2
D	Std 7,50E+00	Std 7,50E+00	Unk SYBR FaF2i	Unk SYBR FaF2i	Unk SYBR FaF2A e1	Unk SYBR FaF2A e1	Unk SYBR FaF2B e1	Unk SYBR FaF2B e1	Unk SYBR FaF2A e2	Unk SYBR FaF2A e2	Unk SYBR FaF2B e2	Unk SYBR FaF2B e2
E	Std 1,00E+01	Std 1,00E+01	Unk SYBR UaF2i	Unk SYBR UaF2i	Unk SYBR UaF2A e1	Unk SYBR UaF2A e1	Unk SYBR UaF2B e1	Unk SYBR UaF2B e1	Unk SYBR UaF2A e2	Unk SYBR UaF2A e2	Unk SYBR UaF2B e2	Unk SYBR UaF2B e2
F	Std 1,50E+01	Std 1,50E+01	Unk SYBR Choi	Unk SYBR Choi	Unk SYBR ChoA e1	Unk SYBR ChoA e1	Unk SYBR ChoB e1	Unk SYBR ChoB e1	Unk SYBR ChoA e2	Unk SYBR ChoA e2	Unk SYBR ChoB e2	Unk SYBR ChoB e2
G												
H									NTC SYBR Branco	NTC SYBR Branco	NTC SYBR Branco	NTC SYBR Branco

Figura 4.11: Configuração da placa do PCR quantitativo utilizada para cada par de *primers* testados.

Na quantificação relativa determina-se o número de cópias da porção do gene de interesse entre amostras comparadas pelo uso dos parâmetros: Ciclo de quantificação (Cq) e Quantidade inicial (SQ) de DNA calculado pelas concentrações oferecidas para construir a curva padrão. O ciclo de quantificação marca o ponto no qual a amostra entra na fase exponencial de amplificação e, dessa forma, quanto maior a concentração inicial do gene de interesse numa amostra mais rapidamente obter-se-á o Cq. A quantidade inicial (SQ) é um score obtido no momento que se obtém o Cq comparando-se com quantidades informadas da curva de referência. Os valores de Cq e SQ foram utilizados para comparar as amostras de DNA das biomassas nos diferentes tempos das etapas experimentais.

Os parâmetros Cq e SQ foram obtidos utilizando-se o *software* CFX fornecido pelo fabricante do termociclador utilizado (BIO-RAD, USA). Utilizou-se, também, de outros parâmetros apresentados pelo *software* como a curva da temperatura de *melting* (Tm) que indica a especificidade dos *primers* pela ocorrência ou não da formação de dímeros e outras amplificações não específicas, bem como, os parâmetros eficiência de amplificação, coeficiente de correlação e o *slope* da curva de amplificação para avaliação do sucesso das análises de acordo com as recomendações do *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time PCR experiments* (Bustin *et al.*, 2009).

#### 4.4 - TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados obtidos nos experimentos foram tabelados usando o Excel 2013 (Office 365 University). Para o tratamento estatístico dos dados utilizou-se o software IBM SPSS Estatistic 22 (Código Licença - Autorização da Versão para Teste).

Os dados brutos de concentrações dos íons envolvidos na estequiometria da reação anammox, sendo eles amônia ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) foram convertidos de  $\text{mg.L}^{-1}$  para mM de N- $\text{NH}_4^+$ ; N- $\text{NO}_2^-$  e N- $\text{NO}_3^-$ .

Na etapa 1 foram realizadas 12 bateladas para todos os 12 sistemas biológicos estudados (a partir de 6 inóculos de origens diferentes x 2 repetições), tendo sido verificadas as concentrações dos íons nos tempos T0 (início das bateladas – 0 hora) e em T1 (intervalos de 5~7 dias após o início das bateladas). Com os resultados das concentrações dos íons (N-

$\text{NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  em mM) nesses tempos foram obtidas as conversões dessas formas nitrogenadas pelas diferenças nas concentrações entre os intervalos de tempo T0\_T1.

Para a etapa 2 foram realizadas 10 bateladas para todos os 12 sistemas biológicos estudados (a partir dos sistemas montados para a etapa 1 com 6 inóculos de origens diferentes x 2 repetições) tendo sido verificadas as concentrações dos íons nos tempos T0 (início das bateladas – 0 hora); T1 (24 horas depois do início das bateladas); T2 (48 horas depois do início das bateladas) e T3 (72 horas depois do início das bateladas). Com os resultados das concentrações dos íons ( $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  em mM) nesses tempos foram obtidas as conversões dessas formas nitrogenadas pelas diferenças nas concentrações entre os intervalos de tempo T0\_T1 (0 a 24 horas); T1\_T2 (24 a 48 horas); T0\_T2 (0 a 48 horas); T2\_T3 (48 a 72 horas) e T0\_T3 (0-72 horas).

De forma a aumentar o poder das variáveis comparativas entre os sistemas biológicos testados durante a etapa 2 construiu-se variáveis de ordens secundária e terciária pela agregação das variáveis primárias. A variável de ordem secundária foi a relação entre as diferenças entre as concentrações de  $\text{N-NO}_2^-$  (mM) e  $\text{N-NH}_4^+$  (mM) entre os intervalos de tempo dentro de cada batelada, conforme equação 4.3.

$$R_{NiAm_{N_{titj}}} = \left[ \frac{NO_{2ti}^- - NO_{2tj}^-}{NH_{4ti}^+ - NH_{4tj}^+} \right] \quad \text{Equação 4.3}$$

Sendo:

$R_{NiAm_{N_{titj}}}$  = Relação molar entre as concentrações de  $\text{N-NO}_2^-$  (mM) e  $\text{N-NH}_4^+$  (mM) entre o intervalo de tempos considerados.

$t_i$  = Tempo anterior do intervalo considerado para o cálculo

$t_j$  = Tempo posterior do intervalo considerado para o cálculo

$NO_{2ti}^-$  e  $NO_{2tj}^-$  = Concentração molar de  $\text{N-NO}_2^-$  no tempo anterior e posterior do intervalo considerado para o cálculo.

$NH_{4ti}^+$  e  $NH_{4tj}^+$  = Concentração molar de  $\text{N-NH}_4^+$  no tempo anterior e posterior do intervalo considerado para o cálculo.

A variável de ordem terciária foi estruturada pela relação entre a diferença entre concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mM) com a diferença entre as concentrações conjuntas de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mM) e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mM) entre os intervalos de tempo dentro de cada batelada, conforme equação 4.4.

$$R\_Na\_NiAm\_N_{titj} = \left[ \frac{NO_{3tj}^- - NO_{3ti}^-}{\left( NH_{4ti}^+ - NH_{4tj}^+ \right) + \left( NO_{2ti}^- - NO_{2tj}^- \right)} \right] \quad \text{Equação 4.4}$$

Sendo:

R\_Na\_NiAm\_N<sub>titj</sub> = Relação molar entre as concentrações de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>\_N (mM) sob a conversão conjunta das concentrações de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mM) e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mM) entre o intervalo de tempos considerados.

t<sub>i</sub> = Tempo anterior do intervalo considerado para o cálculo

t<sub>j</sub> = Tempo posterior do intervalo considerado para o cálculo

NO<sub>2ti</sub><sup>-</sup> e NO<sub>2tj</sub><sup>-</sup> = Concentração molar de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no tempo anterior e posterior do intervalo considerado para o cálculo.

NH<sub>4ti</sub><sup>+</sup> e NH<sub>4tj</sub><sup>+</sup> = Concentração molar de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no tempo anterior e posterior do intervalo considerado para o cálculo.

NO<sub>3tj</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3ti</sub><sup>-</sup> = Concentração molar de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no tempo posterior e anterior do intervalo considerado para o cálculo.

No entanto, para análise dos dados de normalidade e homogeneidade para os testes estatísticos de comparações entre os sistemas realizou-se a transformação dos dados obtidos nessas relações estequiométricas porque ocorreram diferenças grandes entre as reduções das concentrações de amônia e nitrito, bem como na produção de nitrato que resultaram em distribuições de frequências dos escores com muitos valores atípicos e extremos. Dessa maneira, realizou-se a transformação dos dados usando o logaritmo na base 10 (Log<sub>10</sub> (X<sub>i</sub> +2)). Adicionou-se uma constante igual a 2 ao escore obtido da relação entre as reduções das concentrações de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mM) e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mM). O objetivo do acréscimo da constante igual a 2 foi evitar os escores iguais a zero e negativos visto que os mesmos não podem ser obtidos na escala logarítmica (Field, 2009). Portanto procedeu-se a análise de sensibilidade da

seguinte forma conforme as equações 4.5 e 4.6:

$$T\_NiAm\_N_{titj} = \text{Log}_{10} \left( \left[ \frac{NO_{2ti} - NO_{2tj}}{NH_{4ti} - NH_{4tj}} \right] + 2 \right) \quad \text{Equação 4.5}$$

$$T\_Na\_NiAm\_N_{titj} = \text{Log}_{10} \left[ \left( \frac{NO_{3tj} - NO_{3ti}}{(NH_{4ti} - NH_{4tj}) + (NO_{2ti} - NO_{2tj})} \right) + 2 \right] \quad \text{Equação 4.6}$$

Sendo:

T\_NiAm\_N<sub>titj</sub> = Relação transformada de R\_NiAm\_N<sub>titj</sub>

T\_Na\_NiAm\_N<sub>titj</sub> = Relação transformada de R\_Na\_NiAm\_N<sub>titj</sub>

A relação estequiométrica ideal entre nitrito e amônia pela reação anammox é igual a 1,32 e com a transformação torna-se 0,521. Enquanto, a relação estequiométrica ideal entre nitrato com a redução concomitante de amônia e nitrito pela reação anammox é 0,28 e com a transformação torna-se 0,358.

Os escores obtidos pelas diferenças nas concentrações dos íons N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mM) e pela realização das relações entre variáveis primárias consolidadas em variáveis secundária e terciária entre os diferentes intervalos de tempo dentro de cada batelada para as etapas 1 e 2 foram avaliados quanto à sua distribuição normal e homogeneidade das amostras.

Para testar se as distribuições dos dados desviaram de uma distribuição normal utilizaram-se os testes de Kolmogorov-Smirnov (D) e de Shapiro-Wilk (D), que comparam escores de uma amostra a uma distribuição normal modelo de mesma média e variância dos valores encontrados nas amostras. No entanto, optou-se pelas significâncias obtidas com os testes de Shapiro-Wilk (D), que representam maior robustez quando o número de amostras é pequeno (Field, 2009). Nesse estudo, para cada condição testada o tamanho das amostras foi igual a 12 (Etapa 1) e 10 (Etapa 2). Quando o teste não foi significativo (p > 0,05), inferiu-se que os dados das amostras não diferiram significativamente de uma distribuição normal.



Por outro lado, quando o teste foi significativo ( $p \leq 0,05$ ) a distribuição em questão foi significativamente diferente de uma distribuição normal.

A homogeneidade entre as amostras foi testada na etapa 1 e 2 considerando-se a variância entre as duplicatas de cada sistema biológico A e B. Para a etapa 2, também, foram realizados testes de homogeneidade das amostras entre os intervalos de tempos estudados, ou seja, verificou-se as variâncias entre os intervalos de tempos T0\_T1; T1\_T2; T0\_T2; T2\_T3; T0\_T3 (que foram as variáveis comparadas) distorciam igualmente da média entre os intervalos para cada sistema.

Para essa avaliação de homogeneidade utilizou-se o teste de Levene (F). Esse teste verificou a hipótese de que a variância nos grupos foi a mesma (isto é, se a diferença entre as variâncias foi zero). Dessa forma, o teste de Levene foi significativo quando  $p \leq 0,05$ , concluindo-se que a hipótese nula estava incorreta e que as variâncias foram significativamente diferentes. No entanto, quando o teste de Levene não foi significativo (isto é,  $p > 0,05$ ), aceitou-se a hipótese nula de que as diferenças entre as variâncias foi zero, ou seja, as variâncias foram estatisticamente iguais.

Essas avaliações de normalidade e homogeneidade foram realizadas para definição dos testes estatísticos utilizados. Os usos de testes estatísticos paramétricos pressupõem que os dados sigam uma distribuição normal e tenham variâncias homogêneas.

Na etapa 1, como os escores obtidos entre a diferença das concentrações dos íons  $\text{N-NO}_3^-$ ;  $\text{N-NO}_2^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  (mM) nos tempos T0\_T1 dos sistemas biológicos resultaram em distribuições normais e homogêneas para todos os sistemas biológicos testados e íons avaliados definindo-se por realizar um Teste  $t$  Dependente para comparar se as médias das concentrações dos íons nos sistemas biológicos A e B inoculados com o mesmo lodo foram estatisticamente semelhantes e, portanto, como duplicatas.

Dada a natureza das amostras e os resultados das avaliações da normalidade e homogeneidade dos dados para cada sistema durante a etapa 2, definiu-se pela utilização dos testes estatísticos não-paramétricos de Wilcoxon (T) de Postos com Sinais para comparar se as duplicatas de cada sistema biológico inoculado com o mesmo lodo comportaram, em termos de conversões para as formas nitrogenadas, estatisticamente semelhantes. Considera-se no teste que  $H_0$ : Sistema A = Sistema B e  $H_1$ : Sistema A  $\neq$  Sistema B e, para tanto, os sistemas A e B foram considerados como variáveis dependentes.

Para verificar se houve diferenças entre os sistemas biológicos nas conversões das formas nitrogenadas  $N-NO_3^-$ ;  $N-NO_2^-$  e  $N-NH_4^+$  (mM), dadas pelas variáveis obtidas pelas relações entre os íons, também, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (H) que permite avaliar se existe diferenças entre vários grupos independentes. O Teste de Kruskal-Wallis foi uma alternativa ao ANOVA independente de um fator.

O Teste  $t$  é, em resumo, a razão da variação sistemática no experimento para a variação não sistemática (Field, 2009).

No Teste de Wilcoxon (T) de Postos com Sinais calculou-se a diferença entre as observações de cada amostra (teste e tempo) das duas variáveis dependentes, nesse caso sistema A e sistema B e, depois essas diferenças foram transformadas em postos, mas o sinal da diferença (se positiva ou negativa) foi atribuído a cada posto. Ao final, separou-se os postos com sinais negativos e positivos e, obteve-se a soma dos postos com mesmos sinais. A estatística desse teste (T) foi utilizar o menor dos dois valores obtidos na soma dos postos com sinais diferentes (valor T).

A significância do teste foi obtida com o cálculo da média  $\bar{T}$ , do erro padrão do teste ( $EP_T$ ) e do cálculo de  $Z$ , onde  $n$  é o tamanho das amostras dos sistemas testados, de acordo com as equações 4.7, 4.8 e 4.9:

$$\bar{T} = \frac{n(n+1)}{4} \quad \text{Equação 4.7}$$

$$EP_T = \sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}} \quad \text{Equação 4.8}$$

$$Z = \frac{T - \bar{T}}{EP_T} \quad \text{Equação 4.9}$$

O Teste de Kruskal-Wallis (H) tem como base os postos de valores. Iniciou-se ordenando os escores do menor para o maior, ignorando-se o grupo ao qual o escore pertencia. Após a ordenação, retornaram-se os escores aos grupos as quais eles pertenciam inicialmente e somaram-se os postos atribuídos a cada escore para cada grupo. A soma dos postos de cada grupo foi representada por  $R_i$  ( $i$  representa cada um dos grupos testados). A estatística H foi

calculada usando a equação 4.10:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N-1) \quad \text{Equação 4.10}$$

Sendo:

$R_i$  = soma dos postos para cada grupo

$N$  = total da amostra (somatório de  $n_i$  de cada grupo testado)

$n_i$  = tamanho amostral de cada um dos grupos testados

$k$  = graus de liberdade (número de grupos menos um)

Essa estatística teste tem um tipo especial de distribuição conhecida como Qui-Quadrado e, para isso, essa distribuição possui um parâmetro denominado graus de liberdade, que é o número de grupos menos um ( $k-1$ ).

As análises *post hoc* para o teste de Kruskal-Wallis, que buscava quais os sistemas que foram responsáveis pelas diferenças entre as relações nos tempos testados, não foram realizadas pois as opções seriam os testes de Mann-Witney que faz comparação em pares. Nesse caso o tratamento estatístico compararia 7 sistemas duplas e aumentaria a possibilidade de incorrer no erro tipo I (quando aceita um efeito que na verdade não existe).

Para reduzir as chances de cometer o erro tipo I, deve-se aplicar a correção de *Bonferroni* que divide o valor crítico de significância de 0,05 pelo número de comparações a serem feitas. Na situação em estudo equivaleria a serem realizadas 20 comparações, que para serem significativamente diferentes teriam que apresentar  $p < 2,5 \cdot 10^{-3}$ .

Outra opção de teste *post hoc* tem semelhanças com o de Mann-Witney, por fazer comparações entre duplas do fator de grupo em estudo, no entanto, envolveria tomar a diferença entre as médias dos postos dos diferentes grupos comparadas com um valor  $Z$  (corrigido pelo número de comparações sendo feitas) e uma constante baseada no tamanho amostral total e nos tamanhos amostrais dos dois grupos sendo comparados, dada pela equação 4.11:

$$|\bar{R}_u - \bar{R}_v| \geq \frac{z_{\alpha/k(k-1)}}{\sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left( \frac{1}{n_u} + \frac{1}{n_v} \right)}} \quad \text{Equação 4.11}$$

Onde:

$|\bar{R}_u - \bar{R}_v|$  = diferença em módulos entre a média dos postos para os dois grupos comparados

k = número de grupos

N = tamanho total da amostra

$n_u$  = tamanho da amostra no grupo 1

$n_v$  = tamanho da amostra no grupo 2

$Z_{\alpha/k(k-1)}$  = valor da curva normal para o qual somente  $\alpha/k(k-1)$ , dos demais valores Z são maiores.

A quantidade de comparações (20) a serem realizadas, produziram valores de significância maiores que  $p = 2,5 \cdot 10^{-3}$  (aplicado a correção de *Bonferroni*), resultando em comparações par a par não significantes e, portanto, não discriminantes dos sistemas.

Com o objetivo de discriminar os sistemas biológicos testados quanto à aproximação de um comportamento metabólico ideal, que seria os sistemas que se aproximassem das relações estequiométricas previstas pela reação anammox, utilizaram-se critérios para comparação tendo-se como referências o número de cópias dos genes relacionados aos micro-organismos envolvidos na ciclagem do nitrogênio esperando-se: 1) Maior número de cópias do gene do RNAr 16S específicos para os micro-organismos anammox obtidos pelo uso dos iniciadores Pla46 F e Amx667 R; 2) Menor número de cópias do gene amoA específicos para os micro-organismos nitrificantes obtidos pelo uso dos iniciadores amoA F e amoA R e do gene do RNAr 16S específicos para os micro-organismos nitrificantes obtidos pelo uso dos *primers* Nitro 1198 F e Nitro 1423 R; 3) Proporção comparada entre número de cópias do gene do RNAr 16S específicos para os micro-organismos do domínio *Bacteria* obtidos pelo uso dos iniciadores Universal 1055 F e Universal 1392 R e o número de cópias dos genes dos grupos envolvidos nas conversões das formas nitrogenadas.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na descrição dos resultados e discussões que se seguem utilizam-se códigos de letras e números para referir-se aos sistemas biológicos conforme a origem dos inóculos inseridos nos sistemas, bem como as letras A e B para diferenciar as duplicatas de cada sistema biológico conforme descrito na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Amostras de lodos e sedimentos utilizados como inóculos nos sistemas biológicos para enriquecimento e atividade anammox.

<b>Inóculo utilizado no sistema</b>	<b>Local de coleta do Inóculo</b>	<b>Sigla Sistema</b>
1) Sedimento do lago	Lago Paranoá, Brasília/DF	<b>Par A e B</b>
2) Lodo de lagoa anaeróbia tratando efluente de abatedouro/frigorífico de bovinos	Frigorífico 1, Araguari/MG	<b>AnF1 A e B</b>
3) Lodo de lagoa facultativa tratando efluente de abatedouro/frigorífico de bovinos	Frigorífico 1, Araguari/MG	<b>FaF1 A e B</b>
4) Lodo de lagoa facultativa tratando efluente de abatedouro de bovinos e suínos	Frigorífico 2, Uberlândia/MG	<b>FaF2 A e B</b>
5) Lodo de reator UASB tratando efluente de abatedouro de bovinos e suínos	Frigorífico 2, Uberlândia/MG	<b>UaF2 A e B</b>
6) Sedimento de lagoa de acumulação de chorume de aterro de resíduos sólidos	Aterro controlado Jockey Clube, Brasília/DF	<b>Cho A e B</b>

### 5.1 - CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS AMBIENTAIS UTILIZADOS COMO FONTE DE INÓCULOS

As características químicas dos sistemas ambientais, tais como as concentrações de amônia e carbono podem interferir na composição da comunidade microbiana a ser desenvolvida nos sistemas biológicos testados, limitando o sucesso dos micro-organismos responsáveis pelo processo anammox. Essas substâncias provocam inibição ao metabolismo dessas bactérias (Tsushima *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2012), além das elevadas concentrações de carbono favorecerem o desenvolvimento de micro-organismos heterotróficos que competem por substratos com os organismos anammox (Ni *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2013; Jenni *et al.*, 2014). Espera-se mais sucesso no enriquecimento de micro-organismos anammox em

sistemas biológicos quando em presença de menores concentrações de carbono e menor relação C/N (Wang *et al.*, 2011; Li-Dong *et al.*, 2012). No entanto, em recente pesquisa, discute-se a adequabilidade de se tratar efluentes com elevada razão C/N pelo processo anammox, desde que a fonte de carbono orgânico possa ser também consumida por algumas bactérias responsáveis pelo processo anammox que possuem habilidade para oxidar acetato, propionato com a redução do nitrato (Jenni *et al.*, 2014).

Os sistemas ambientais de onde foram retirados os inóculos (Tabela 5.1) apresentaram diferenças em suas características físico-químicas resultantes das condições de cada habitat escolhido (Tabela 5.2). Os lodos e sedimentos coletados foram bem homogeneizados para avaliação dos parâmetros químicos.

Os sistemas de tratamento de águas residuárias de abatedouros de bovinos e suínos apresentaram elevadas concentrações de nitrogênio e de carbono (Tabela 5.2). Essas elevadas concentrações são decorrentes do tipo de água residuária tratada com presença de sangue e gorduras oriundos do abate e do processamento das carnes e do estrume dos animais abatidos. Ainda, no sedimento da lagoa de armazenamento de chorume do aterro controlado do Jockey Club de Brasília, também, apresentou altas concentrações de nitrogênio e carbono resultantes dos processos de estabilização dos resíduos sólidos depositados no aterro.

O sedimento coletado a partir do Lago Paranoá, como esperado pelas características de sua origem, apresentou concentrações de nitrogênio e carbono bem menores do que as dos sistemas de tratamento de águas residuárias (Tabela 5.2). No entanto, as elevadas concentrações nitrato no sedimento do Lago Paranoá indicam que esse manancial recebe contribuições de cargas difusas de poluição, especialmente relatadas nos estudos de contribuição da drenagem urbana para a poluição do Lago Paranoá (Costa, 2013b). O pH variou de acordo com os sistemas ambientais de coleta, sendo mais ácido (pH 5,73) no sedimento do lago Paranoá e mais alcalino (pH 8,38) no sedimento da lagoa de acumulação de chorume. O pH dos sistemas de tratamento de águas residuárias de abatedouros de bovinos e suínos variaram entre 6,63 a 7,91. A temperatura em todos os habitats encontrava-se em faixa mesofílica (25 a 28 °C).

A relação entre carbono orgânico dissolvido, lido como DQO filtrada, e nitrogênio (DQO/N) foi variante entre os diferentes ambientes selecionados como fontes de inóculos (Tabela 5.2). Somente no sedimento proveniente do lago Paranoá (Par) e no lodo da lagoa anaeróbia do

Frigorífico 1 (AnF1) é que houve razão DQO/N menor que 0,6. Nos lodos das lagoas facultativas do Frigorífico 1 (FaF1) e do Frigorífico 2 (FaF2) e do reator UASB do Frigorífico 2 (UaF2) a razão DQO/N calculada foi de 1,02 e 1,42, enquanto na lagoa de chorume do aterro Jockey Clube de Brasília (Cho) a razão DQO/N foi maior do que 2. Tem-se discutido a utilização do tratamento de águas residuárias ricas em amônia e com baixa razão C/N pelo processo anammox, ou seja  $< 0,5 \text{ g COD.g}^{-1}\text{N}$ . A remoção de nitrogênio pelo processo biológico convencional de desnitrificação heterotrófica requer  $1,72 \text{ g COD.g}^{-1}\text{N}$  (Ahn, 2006). Jenni *et al.* (2014) demonstraram a adequabilidade de efluentes com razão entre 0,5 e  $1,72 \text{ g de COD N}^{-1}$  para serem tratados pelos processos de nitrificação e anammox.

Tabela 5.2: Avaliação das características químicas dos ambientes utilizados como fonte de inóculos nos experimentos para enriquecimento e atividade anammox.

Parâmetros	Origem Lodo/Sedimento <sup>1</sup>					
	Par	AnF1	FaF1	FaF2	UaF2	Cho
NTK (mg.L <sup>-1</sup> )	6,38	236,25	168,75	215,6	717,0	860
<b>NTotal (mg.L<sup>-1</sup>)<sup>2</sup></b>	<b>138,2</b>	<b>517,75</b>	<b>351,25</b>	<b>599,6</b>	<b>1724,0</b>	<b>914,0</b>
NH <sub>4</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	5,1	173,3	168,30	203,4	705,0	824,0
NO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	24	100,0	60,0	160,0	540,0	18,0
NO <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	107,8	181,5	122,5	224,0	479,0	36,0
<b>DQO (mg.L<sup>-1</sup>)<sup>3</sup></b>	<b>64,0</b>	<b>305,0</b>	<b>355,0</b>	<b>610,0</b>	<b>2455,00</b>	<b>1878,0</b>
<b>Razão DQO/N</b>	<b>0,46</b>	<b>0,59</b>	<b>1,01</b>	<b>1,02</b>	<b>1,42</b>	<b>2,05</b>

<sup>1</sup> Par: Lago Paranoá, Brasília/DF; AnF1: lagoa anaeróbia do Frigorífico 1, Araguari/MG; FaF1: lagoa facultativa do Frigorífico 1, Araguari/MG; FaF2: lagoa facultativa do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; UaF2: lodo de reator UASB do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; Cho: lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Club/DF.

<sup>2</sup> N total = [NTK + NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>]; <sup>3</sup> DQO filtrada

Pelas características químicas, especialmente a razão C/N, presentes nos sedimentos do Lago Paranoá (Par) e nos lodos das lagoas dos frigoríficos (AnF1, FaF1, FaF2) esperava-se que os sistemas biológicos inoculados com biomassas dessas origens apresentassem melhor performance para o desenvolvimento dos micro-organismos, visto que as concentrações de tais componentes químicos são determinantes para o sucesso no estabelecimento da atividade anammox.

Outra característica importante a ser apresentada é a composição dos sólidos em cada um dos lodos e sedimentos dos sistemas ambientais selecionados. O sedimento do lago Paranoá (Par), da lagoa facultativa do Frigorífico 2 (FaF2) e da lagoa de acumulação de chorume do aterro Jockey Club de Brasília (Cho) constituía-se de muita matéria inorgânica (areias, argilas e siltes) típicas das condições de onde foram coletados, ou seja, a partir de sedimentos (Tabela 5.3). Essa constituição pode interferir na sedimentabilidade da biomassa nos sistemas biológicos testados. A argila, o principal constituinte desses sedimentos, devido ao pequeno diâmetro de suas partículas – em torno de 0,002 mm, apresenta velocidade de sedimentação baixa ainda que esteja agregada a micro-organismos e moléculas orgânicas (Tomaz, 2013). Observou-se que a sedimentação das biomassas proveniente dos sedimentos foi mais lenta quando comparados às biomassas oriundas dos lodos dos sistemas ambientais da lagoa anaeróbia do Frigorífico 1 (AnF1); lagoa facultativa do Frigorífico 1 (FaF1) e do reator UASB do Frigorífico 2 (UaF2), que se apresentavam em forma de flocos.

Tabela 5.3: Composição dos sólidos nos lodos e sedimentos utilizados nos sistemas biológicos testados.

<b>Origem</b>	<b>Sólidos Fixos</b>	<b>Sólidos Voláteis</b>	<b>Sólidos Totais</b>	<b>Biomassa</b>
<b>Inóculo<sup>1</sup></b>	(% em 1g) (mgSF.g <sup>-1</sup> )	(% em 1g) (mg SV.g <sup>-1</sup> )	(% em 1g) (mg ST.g <sup>-1</sup> )	<b>inserida</b>
				(g.L <sup>-1</sup> )
<b>Par</b>	(40,89) (0,409)	(6,91) (0,069)	(47,80) (0,478)	1,73
<b>AnF1</b>	(1,81) (0,018)	(5,77) (0,058)	(7,58) (0,076)	1,44
<b>FaF1</b>	(5,02) (0,050)	(6,87) (0,069)	(11,89) (0,119)	1,72
<b>FaF2</b>	(21,09) (0,211)	(8,38) (0,084)	(29,47) (0,295)	2,10
<b>UaF2</b>	(1,79) (0,018)	(8,95) (0,089)	(10,73) (0,107)	2,24
<b>Cho</b>	(33,51) (0,335)	(6,65) (0,066)	(40,16) (0,402)	1,66

<sup>1</sup> **Par**: Lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1**: lagoa anaeróbia do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1**: lagoa facultativa do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2**: lagoa facultativa do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2**: lodo de reator UASB do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **Cho**: lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Club/DF.

A sedimentabilidade da biomassa nos sistemas biológicos em bateladas é importante para garantir a permanência dos micro-organismos nos sistemas, principalmente, daqueles de crescimento lento como são as bactérias que realizam o processo anammox. Além do mais, discute-se que o crescimento de micro-organismos heterotróficos pode também colaborar para a redução da sedimentabilidade da biomassa, uma vez que, devido ao rápido



crescimento dos organismos heterotróficos, os flocos formados são pequenos e, portanto, mais lentos para decantar (Jenni *et al.*, 2014).

Nas duas etapas do desenvolvimento desse trabalho promoveram-se longos períodos de sedimentação, tendo sido 1 e 2 horas para as etapas 1 e 2, respectivamente, na operação das bateladas sequenciais. O objetivo desse período longo foi justamente garantir a permanência da biomassa desenvolvida dentro dos sistemas biológicos.

Ocorreram grandes diferenças entre os sólidos fixos e totais dos diferentes sedimentos e lodos utilizados nos sistemas biológicos testados. No entanto, a concentração de sólidos voláteis foi relativamente próxima, oscilando entre 5,77% a 8,95% dos sólidos totais (Tabela 5.3). Dessa maneira, a concentração de biomassa inserida nos sistemas biológicos foi aproximadamente entre 1,44 a 2,24 g.L<sup>-1</sup> obtida pelos percentuais de sólidos voláteis nas amostras. Em estações de tratamento em escala plena, adotando-se os reatores em bateladas sequencias, tem-se utilizado conteúdo de sólidos voláteis entre aproximadamente 1 a 4,5 g.L<sup>-1</sup>, inferindo-se a biomassa a partir dos sólidos voláteis (Lackner *et al.*, 2014).

Os reatores utilizados nos experimentos de enriquecimento e atividade anammox, conforme descrito no Capítulo Materiais e Métodos, foram inoculados com 25 ml (= 25 g) de lodo e 975 mL de água residuária sintética e substratos.

Conforme discutido por Ni *et al.* (2012), em sistemas biológicos onde podem ser acumuladas substâncias poliméricas extracelulares, materiais inertes residuais, produtos solúveis decorrentes do metabolismo microbiano podem significativamente influenciar a composição da comunidade microbiana em um sistema ajustado para atividade anammox. Além do mais, Tsushima *et al.* (2007) mencionam que os compostos orgânicos e/ou tóxicos aderidos originalmente no inóculo podem inibir a atividade de bactérias anammox.

Alguns pesquisadores têm realizado a lavagem dos inóculos, antes da inserção nos sistemas, com a água residuária teste buscando evitar que substâncias presentes nos inóculos interfiram no sucesso do enriquecimento de micro-organismos (Schierholt Neto, 2007; Lidong *et al.*, 2012; Costa, 2013). No entanto, como realizado nos experimentos desse trabalho de tese, muitas pesquisas também introduzem os inóculos sem prévia manipulação e lavagem dos mesmos, visando a compreensão dos resultados para aplicação posterior em projetos em escalas piloto e plena, quando tais procedimentos seriam inviáveis, bem como avaliar os efeitos da competição entre micro-organismos heterotróficos e anammox e da concentração

de determinadas substâncias no sucesso da atividade anammox (Quan *et al.*, 2008; Sánchez-Melsió *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Ni *et al.*, 2012). Tendo inclusive pesquisa que avaliou o efeito da manipulação do inóculo antes de sua inserção nos sistemas biológicos. A pré-lavagem do lodo promoveu uma redução do carbono orgânico e de bactérias heterotróficas e conseqüentemente uma maior abundância de micro-organismos anammox. No entanto, comprovou-se que maior riqueza e equidade entre espécie são determinantes para rápida partida de reatores, pois favorece a funcionalidade do sistema sobre *stress* seletivo (Tao *et al.*, 2013).

## 5.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS INÓCULOS

Para a caracterização da biomassa dos diferentes inóculos testados foi realizado a extração de DNA genômico para aplicação em técnicas de biologia molecular. Para tanto foi avaliado o rendimento obtido com as extrações do DNA a partir de 0,5 g dos inóculos usando o kit PowerSoil tendo-se um volume final de 100 µL às diferentes concentrações de DNA genômico para cada biomassa presente nos inóculos (Tabela 5.4) (Apêndice I – CD).

Após extração do DNA genômico da comunidade microbiana presente nos inóculos, a realização de eletroforeses em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (1 µg.mL<sup>-1</sup>), demonstraram que as biomassas nos inóculos provenientes do sedimento do lago Paranoá, Brasília, DF (Par), dos sistemas de lagoa anaeróbia e facultativa do frigorífico 1, Araguari, MG (AnF1 e FaF1) e lagoa facultativa do frigorífico 2, Uberlândia (FaF2) apresentaram padrões de bandas de DNA genômico satisfatórios quando comparados com *High Mass Ladder*. Esses resultados indicam como o DNA genômico apresentava-se em quantidade e qualidade, sem rastros indicativos de fragmentação do DNA (Tabela 5.4). Por outro lado, o DNA genômico proveniente das primeiras tentativas de extrações de DNA das biomassas nos inóculos do reator UASB tratando água residuária do frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2) e da lagoa de acumulação de chorume do aterro Jockey Clube, Brasília, DF (Cho) não resultaram em concentrações detectáveis. O licor misto do UASB tratando água residuária de abatedouro de bovinos e suínos e da lagoa de chorume provavelmente apresentam características complexas com presença de substâncias que interagiram com os componentes do kit de extração de DNA PowerSoil da MoBio, dificultando a obtenção de DNA genômico.

Devido à complexidade das águas residuárias do UASB tratando efluente de abatedouro de bovinos e suínos do frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2) e da lagoa de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília, DF (Cho) pode-se esperar a ocorrência de substâncias inibidoras e, assim, uma maior toxicidade selecionando bactérias mais resistentes no *pool* genômico das amostras de lodos desses ambientes. Shen *et al.* (2012) também citam a complexidade e biotoxicidade de águas residuárias provenientes de indústria produtora de glutamato monossódico e de chorume, mas lograram sucesso, após um ano, no enriquecimento de micro-organismos anammox na biomassa tendo utilizado inóculos provenientes de estações de tratamento dessas águas residuárias.

Foram feitas outras tentativas para melhorar a qualidade e quantidade de DNA Genômico obtidos a partir da biomassa nos inóculos do UaF2 e Cho, usando-se de estratégias de lavagens com água residuária sintética e uso diferenciado de massas de lodos. No entanto, não houve melhorias significativas na quantidade de DNA genômico para as extrações realizadas com o inóculo proveniente da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília, DF (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Avaliação do rendimento do DNA genômico extraído da biomassa dos seis inóculos utilizados nos sistemas biológicos para enriquecimento anammox.

Inóculo	Quantidade estimada ( $\eta\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )
<b>Par</b>	56
<b>AnF1</b>	22
<b>FaF1</b>	44
<b>FaF2</b>	8
<b>UaF2 1<sup>a</sup> ext.</b>	< LD*
<b>UaF2 0,25 g.</b>	56
<b>UaF2 0,5g</b>	30
<b>Cho 1<sup>a</sup> ext.</b>	< LD*
<b>Cho 0,25g</b>	5
<b>Cho 0,5g</b>	4

**Par:** sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1:** lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1:** lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2:** lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2:** lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **Cho:** sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília/DF. \* LD: limite de detecção.

A avaliação do potencial dos inóculos para partidas de sistemas biológicos, visando a atividade anammox, pode ser realizada pela verificação da presença dos micro-organismos capazes de realizar a oxidação anaeróbia da amônia usando o nitrito como acceptor de elétrons. A verificação foi realizada pela detecção de fragmentos amplificados por PCR convencional e pela quantificação do número de cópias dos genes que codificam para porções alvos do RNAr 16S ( $\eta\text{g cópias}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) por PCR quantitativa utilizando *primers* específicos ao grupo de micro-organismos Planctomycetes e dos grupos de micro-organismos nitrificantes aeróbios, para entendimento dos processos metabólicos predominantes nos sistemas biológicos testados.

A realização de análises de PCR, tendo como moldes fragmentos de DNA genômico obtidos a partir das biomassas presentes nos lodos e sedimentos, amplificando genes alvos de bactérias anammox em diferentes ecossistemas aumenta o conhecimento do espectro genético e ecológico desse grupo de micro-organismos e ajuda a melhorar o monitoramento desses organismos em sistemas de tratamento de águas residuárias (Quan *et al.*, 2008; Kartal *et al.*, 2012; Costa, 2013; Sánchez *et al.*, 2014).

Dessa maneira, usando-se a combinação dos *primers* Pla 46F e Amx 820R, específicos para amplificação de fragmento do gene que codifica RNAr 16S de organismos relacionados aos gêneros “*Candidatus Brocadia*” e “*Ca. Kuenenia*”, nas condições testadas por Araújo *et al.* (2010), foi possível obter *amplicons* de tamanhos aproximados de 774 pb a partir do DNA Genômico obtido das biomassas antes do enriquecimento, à exceção do DNA Genômico obtido da biomassa presente no inóculo do sedimento da lagoa de acumulação de chorume (Cho) (Tabela 5.5) . No entanto, a ausência de ampliações anammox na biomassa do sedimento de chorume não exclui a possibilidade desses organismos estarem originalmente nesse ambiente. Sánchez-Melsió *et al.* (2009) não conseguiram amplificar fragmentos de DNA anammox antes do enriquecimento em 13 lodos usados como inóculos, dado os limites de quantificação pela técnica de PCR, mas após o período de um ano de enriquecimento foi registrada a presença de bactérias anammox em todos os sistemas, pela análise das ampliações em PCR, mas fazendo uso da combinação dos *primers* Pla46F e Amx 368R, que permite a detecção de todos os organismos anammox presentes. Costa (2013) não conseguiu resultados de ampliações para amostras obtidas em algumas câmaras de reatores UASB, *wetland* plantado (amostra a 50 cm de profundidade) e de lagoa de polimento tratando esgotos. Cita-se a combinação dos *primers* Amx 368F e Amx 820R como

eficientes para a detecção de todos os organismos Planctomycetales (Schmid *et al.*, 2003).

Alguns pesquisadores também obtiveram resultados positivos característicos de amplificações anammox a partir das biomassas coletadas para avaliação de inóculos que serviriam para experimentação visando atividade anammox, tendo usado os *primers* Pla 46F e Amx 820R. Assim, foram registradas amplificações de fragmentos de DNA para inóculos provenientes de sistema convencional de lodos ativados da estação de tratamento de esgotos em Belo Horizonte, MG (Araújo *et al.*, 2010), de lagoa aerada, biodiscos, lagoa de polimento, caixas de sistemas de distribuição por bombas em sistemas de tratamento para águas residuárias oriundas de refinaria de petróleo e de lagoas de polimento, wetlands plantados e não plantados e para alguns reatores UASB tratando esgotos (Costa, 2013), de lagoa de sedimentação em usina de processamento de cana de açúcar (Sánchez *et al.*, 2014).

Tabela 5.5: Resultados das amplificações por PCR das biomassas obtidas a partir dos inóculos testados nos sistemas biológicos.

Inóculos testados	<i>Primers</i> / especificidade			
	Pla46F e Amx820R RNA 16S “ <i>Ca. Brocadia</i> e <i>Kuenenia</i> ”	Ana-hzo1F e-hzo2R Gene hzo	AmoAF e AmoAR <i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitro</i> 1198F e <i>Nitro</i> 1423R - <i>Nitrobacter</i>
Par	+	-	+	+
AnF1	+/-	-	+	+
FaF1	+/-	-	+	+
FaF2	+	-	+	+
UaF2	+/-	-	+/-	+/-
Cho	-	-	+	+

(+) Resultados positivos para os produtos amplificados na PCR visualizados em gel de agarose; (+/-) Resultados positivos com fragmentos amplificados visualizados sem nitidez em gel de agarose. **Par**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1**: lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1**: lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2**: lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **Cho**: sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília/DF (Apêndice I).

Quando usados os conjuntos de *primers* específicos para os genes que codificam a enzima hidrazina oxigenase, exclusiva aos micro-organismos anammox, não se obteve sucesso nas amplificações de fragmentos observáveis em gel de agarose após PCR e eletroforese (Tabela 5.5). Costa (2013) também registrou resultados negativos para 7 amostras de inóculos

provenientes de diferentes partes de sistemas de tratamento de esgoto (lagoas de polimento, *wetlands* plantados, UASB), mas obteve resultados positivos para 6 amostras de águas residuárias de refinaria de petróleo (lagoas aeradas, biodiscos, lagoas de polimento e em caixas de distribuição com bombas) e de *wetlands* em sistemas de esgotos. Quando se obtém resultados positivos de ampliações utilizando *primers* para os genes que codificam enzimas específicas anammox confirma-se a presença de micro-organismos anammox visto que as ampliações ocorridas com *primers* para os genes RNAr 16S podem resultar em ampliações de organismos de todo o grupo Planctomycetes, dos quais alguns não são classificados com habilidade anammox (Hirsch *et al.*, 2010). Portanto, somente o sequenciamento dos fragmentos de 774 bp obtidos a partir de genes RNAr 16S poderão indicar, por análise de similaridade, o grupo pertencente.

Os micro-organismos nitrificantes aeróbios representam potenciais parceiros e/ou competidores com as bactérias anammox, visto que utilizam os substratos amônia e nitrito, e, por isso, a presença desses grupos foi inferida a partir de ampliações positivas em análise de PCR. O primeiro grupo inferido foi o de bactérias aeróbias oxidadoras de amônia, representadas por bactérias como *Nitrosomonas*, por meio da utilização do par de *primers amoA* direto e reverso (Egli, 2003), amplificando fragmentos de aproximadamente 650 pb em todas as amostras analisadas (Tabela 5.5), ainda que as condições iniciais nos locais de amostragem dos inóculos não promovessem a atividade metabólica do grupo. Jetten *et al.* (1999) discutiram que devido à sua versatilidade metabólica podem estar presentes em grande abundância em condições anóxicas. Importante destacar que condições limitantes de oxigênio podem oferecer um ambiente adequados para uma interação estável entre os micro-organismos aeróbios como *Nitrosomonas* e anaeróbios como as bactérias anammox (Sliemers *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010).

O segundo grupo inferido foi o de bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito, representadas por bactérias como *Nitrobacter*, por meio da utilização os *primers Nitro* 1198 direto e *Nitro* 1423 reverso (Graham *et al.*, 2007), amplificando fragmentos de tamanho aproximado de 225 pb (Tabela 5.5). Foram registradas ampliações em todos os inóculos coletados nos vários sistemas ambientais escolhidos, ainda que as condições ambientais não devessem favorecer esse grupo de bactérias, visto que os inóculos foram coletados em locais com concentrações baixas e/ou nulas de oxigênio (Tabela 5.5). Esse grupo de micro-organismos pode tornar-se

um competidor efetivo pelo uso do nitrito, tornando esse substrato limitante em sistemas visando a remoção da amônia tendo o nitrito como acceptor de elétrons.

A avaliação dos resultados da análise de PCR quantitativa (PCRq) permitiu sugerir a representatividade de cada um dos três grupos de micro-organismos: os anammox, os oxidadores aeróbios de amônia (como *Nitrosomonas*) e os oxidadores aeróbios de nitrito (como *Nitrobacter*) no total do DNA genômico extraído a partir de cada um dos inóculos.

O ciclo de quantificação (Cq) foi um dos parâmetros utilizados para realização de uma comparação relativa entre os diferentes inóculos e entre os grupos de micro-organismos de interesse usando os conjuntos de *primers* específicos. A partir dos resultados de Cq obtidos na análise de PCRq inferiu-se que quanto menor o valor de Cq maior o número de cópias iniciais do gene em análise (Figura 5.1). Na Figura 5.2 são demonstrados os resultados obtidos pela avaliação dos inóculos por PCR quantitativa para vários grupos de micro-organismos.

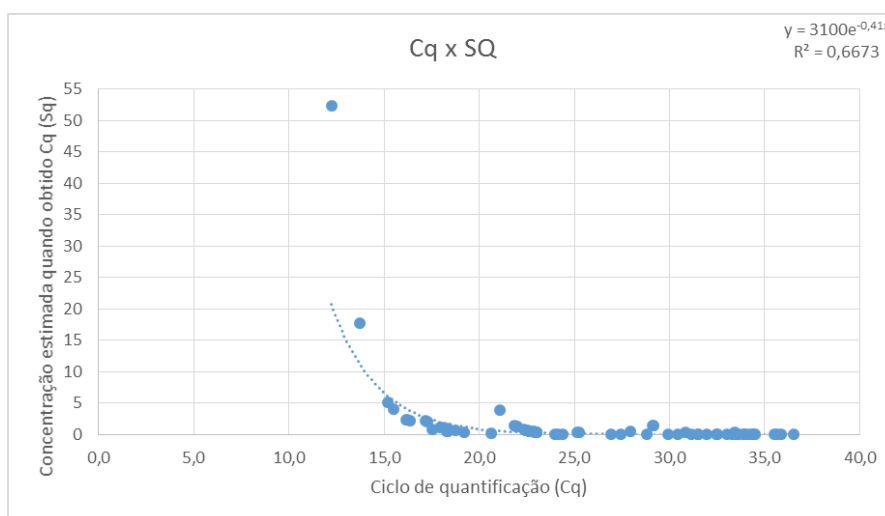


Figura 5.1: Correlação entre o ciclo de quantificação e a concentração de cópias dos genes de interesse quando obtidos os Cq pela análise de PCRq.

Os inóculos provenientes do lodo do reator UASB tratando efluente do frigorífico 1, Uberlândia, MG (UaF2) e do sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado de Brasília, DF (Cho) apresentaram uma menor quantidade de cópias dos genes relacionado ao RNAr 16S das bactérias anammox do que os demais inóculos, sendo o Cq para esses inóculos de 33,04 e 30,44, respectivamente (Figura 5.2). Da mesma forma,

verificou-se que para UaF2 e Cho, o ciclo de quantificação (Cq) foi maior para a amplificação dos genes relacionado ao RNAr 16S das bactérias anammox do que os Cq obtidos para o gene RNAr 16S relacionados com *Nitrobacter*, sugerindo uma maior densidade de cópias do gene RNAr 16S para os oxidadores aeróbios de nitrito do que as bactérias anammox (Figura 5.2).

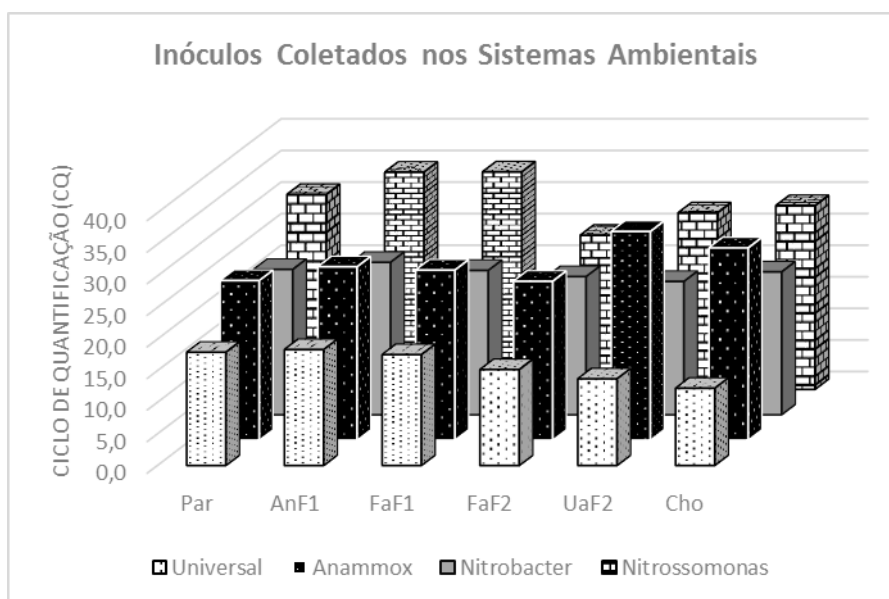


Figura 5.2: Ciclo de quantificação (Cq) obtidos pela análise de PCR quantitativos, testando quatro pares de *primers*, para levantamento do número de cópias de organismos relacionados ao Domínio Bacteria, as bactérias anammox, as oxidadoras aeróbias de nitrito e as oxidadoras aeróbias de amônia. **Par**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1**: lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1**: lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2**: lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **CHOR**: sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF.

Para as biomassas dos outros inóculos (Par, AnF1, FaF1 e FaF2), a partir dos DNA genômicos extraídos, apresentaram Cq próximos para as amplificações dos genes relacionados ao RNAr 16S para os micro-organismos anammox e os aeróbios oxidadores de nitrito (Figura 5.2). Observa-se que para todos os inóculos a densidade de cópias do gene relacionado à enzima amônia mono-oxigenase foi baixa, dados os valores altos de Cq obtidos, ou seja, é necessário um maior número de ciclos de amplificações para se obter uma estimativa de quantificação (Figura 5.2).



Numa análise global, utilizando de *primers* universais para os genes que codificam o RNAr 16S para o Domínio Bacteria, observa-se que os inóculos UaF2 e Cho apresentaram maiores densidade de cópias para o RNAr 16S devido os ciclos de quantificação (Cq) terem sido os menores do que os apresentados pelos demais inóculos, fazendo supor uma maior diversidade genética e de micro-organismos responsáveis por vários outros processos metabólicos (Figura 5.2)

A concentração de biomassa relativa ao grupo anammox é extremamente importante para definição das cargas volumétricas aplicadas em sistemas e conseqüentemente para a eficiência de remoção de nitrogênio (Dapena-Mora *et al.*, 2004; Lackner *et al.*, 2014). No entanto, ficou demonstrado que para o sucesso da atividade anammox, além da concentração de organismos anammox, é necessário que ocorra equitabilidade nas densidades dos grupos que formam as comunidades microbianas relacionadas ao ciclo do nitrogênio (Tao *et al.*, 2013).

Não há uma relação direta entre os parâmetros físico-químico e microbiológicos para distinção dos inóculos quanto ao possível desempenho anammox. No entanto, acredita-se que os inóculos provenientes do sedimento do Lago Paranoá (Par) e dos lodos das lagoas anaeróbia e facultativa dos Frigoríficos (AnF1, FaF1 e FaF2) demonstram apresentar maior potencial para sucesso em enriquecimento e atividade anammox devido às características químicas dos ambientes de onde foram coletados (Tabela 5.2) e dos resultados inferidos pelas análises de PCR convencional e quantitativa (Tabela 5.5 e Figura 5.2).

### **5.3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS MICRO-ORGANISMOS ANAMMOX NAS ETAPAS 1 E 2**

Foram usadas as seguintes evidências para inferir a ocorrência do processo anammox nos sistemas biológicos: 1) avaliação estequiométrica do consumo concomitante de amônia e nitrito numa razão de 1,32 com conseqüente formação de nitrato numa razão de 0,26 (Strous *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2011); 2) aumento no valor do pH do licor dos sistemas biológicos, uma vez que a reação anammox produz alcalinidade (Lackner *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012); 3) presença de micro-organismos anammox nas biomassas avaliadas por análises de PCR

convencional, PCR quantitativa e sequenciamento dos fragmentos de DNA obtidos por PCR (Bae *et al.*, 2010; Hu, *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011).

### **5.3.1 - Etapa 1: Enriquecimento dos micro-organismos anammox**

#### 5.3.1.1 - Comportamento de conversão dos íons nitrogenados ( $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_2^-$ e $\text{NO}_3^-$ )

A avaliação da conversão dos compostos nitrogenados foi interpretada pelas observações de redução das concentrações de amônia e nitrito e aumento das concentrações de nitrato nos diferentes sistemas biológicos utilizados nos experimentos. Verificou-se a normalidade e homogeneidade dos dados obtidos para cada um dos sistemas biológicos ao longo do tempo dos experimentos por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, para  $p < 0,05$ , concluindo-se que, para quase todos os sistemas, os íons de interesse apresentaram distribuição normal e as variâncias entre as duplicatas foram as mesmas. Os sistemas biológicos para os quais os dados obtidos não apresentaram distribuição normal ( $p < 0,05$ ) foram amônia para os sistemas AnF1A e B, nitrato para os sistemas FaF1A e B e amônia e nitrato para o par UaF2A e B (Apêndice II - CD).

Dos sistemas biológicos que se obteve a distribuição normal e homogênea dos íons aplicou-se um teste estatístico de diferenças de médias, o teste  $t$  para amostras dependentes para verificar se os sistemas biológicos A e B, montados com o mesmo inóculo, apresentaram comportamentos de conversão semelhantes (Tabela 5.6). Para os sistemas biológicos que apresentaram resultados para os dados de alguns íons com distribuição não normal aplicou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon de Postos com Sinais, buscando-se comparar as duplicatas A e B dos sistemas biológicos (Tabela 5.6) (Apêndice II - CD).

Com base nos testes estatísticos realizados considerou-se que as duplicatas A e B, para os sistemas biológicos que tiveram como biomassa o mesmo inóculo, apresentaram comportamentos semelhantes de conversão dos íons amônia, nitrito e nitrato e, portanto, os resultados que se seguem são os valores médios obtidos a partir das duplicatas A e B dos sistemas biológicos testados.

Tabela 5.6: Comparação das duplicatas A e B dos sistemas biológicos na conversão dos íons amônia, nitrito e nitrato pelos testes estatísticos: 1) teste *t* para amostras dependentes para  $p < 0,05$  e 2) teste não paramétrico de Wilcoxon de Postos com Sinais para  $p < 0,05$ .

Sistemas Biológicos	Amônia		Nitrito		Nitrato	
	Teste <i>t</i>	Wilcoxon	Teste <i>t</i>	Teste <i>t</i>	Wilcoxon	
ParA e ParB	=		=	=		
AnF1A e AnF1B		=	=	=		
FaF1A e FaF1B	=		=		=	
FaF2A e FaF2B	=		=	=		
UaF2A e UaF2B		=	=		=	
ChoA e ChoB	=		=	=		

Os sistemas biológicos com biomassa proveniente do lago Paranoá (Par) apresentaram comportamento de conversão dos compostos nitrogenados diferenciados dos demais sistemas (Figura 5.3), com a redução nas concentrações de amônia e nitrito e com aumento nas concentrações de nitrato, desde o início dos experimentos.

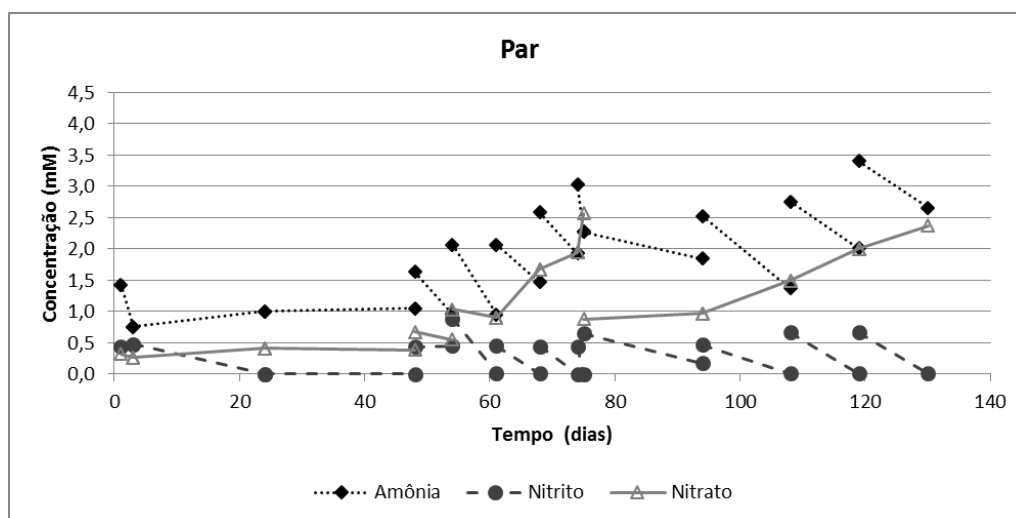


Figura 5.3. Desempenho dos sistemas biológicos com biomassa proveniente de sedimentos do lago Paranoá, Brasília/DF (Par) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de bactérias anammox.

Por razões de ajustes experimentais não foram realizadas as adições de substratos nos sistemas biológicos entre os 24° e 48° dias e, por isso, foi possível constatar que, devido a ausência do nitrito no meio não ocorreu nenhuma conversão de amônia e as concentrações

de nitrato permaneceram constantes (Figura 5.3). Deixou-se de inserir nitrato nesses sistemas biológicos, após 60 dias, uma vez que o mesmo não estava sendo consumido pelo processo de desnitrificação heterotrófica. Infere-se, portanto que, para esses sistemas biológicos (Par) o processo biológico conduzido por micro-organismos anammox prevaleceu após 60 dias, sendo necessária a presença de ambos os substratos amônia e nitrito para modificações das concentrações das formas nitrogenadas no licor misto. A avaliação dos índices estequiométricos das conversões das formas nitrogenadas comparada aos índices esperados quando do predomínio do processo biológico anammox foi realizada, sendo que a razão média ( $\pm s$ ) entre  $[\text{NO}_2^-] / [\text{NH}_4^+]$  foi de 0,73 ( $s = 0,26$ ) e entre  $[\text{NO}_3^-] / [\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+]$  foi de 0,39 ( $s = 0,20$ ), sendo que quanto mais próximas estiverem dos valores 1,32 e 0,28, respectivamente, é um indicativo do metabolismo anammox prevalecendo no sistema.

Nos demais sistemas biológicos foi observada, possivelmente, a conversão da amônia pelo processo anammox conjuntamente com a ocorrência da desnitrificação heterotrófica, uma vez que todo o nitrito e nitrato inseridos e, possivelmente, produzidos nos sistemas foram totalmente removidos (Figuras 5.4 a 5.8). As concentrações iniciais de carbono orgânico nos sistemas quando da montagem dos sistemas biológicos, inferidas pelos resultados obtidos nas análises de DQO, permitiram o estabelecimento do metabolismo de micro-organismos desnitrificantes heterotróficos.

Tem-se também que as modificações do ambiente, ou seja, após a inserção dos inóculos nos sistemas biológicos, os micro-organismos presentes nas biomassas passam a estar expostos ao meio autotrófico e condições anaeróbias gerando a lise de células das bactérias que não se adaptam a essas novas e diferentes condições operacionais. De acordo com Bae *et al.* (2010), ocorreram reduções nas concentrações de SSV em sistemas em bateladas, visando atividade anammox, depois do enriquecimento, possivelmente, devido à lise de bactérias que não se propagaram nas condições estabelecidas nos sistemas.

Ni *et al.* (2012) discutiram as interações entre bactérias anammox e heterotróficas em biofilmes anammox e demonstraram que as razões encontradas entre produção de nitrato e consumo de amônia foram significativamente inferiores à razão proposta por Strous *et al.* (1998), sendo ela igual a 0,28. Esses autores sugeriram que quantidades significativas de nitrato foram usadas como aceptores de elétrons por bactérias heterotróficas quando as mesmas utilizavam outros produtos orgânicos solúveis.

Nos sistemas com lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do frigorífico 1, Araguari/MG (AnF1), a razão média ( $\pm s$ ) entre  $[\text{NO}_2^-] / [\text{NH}_4^+]$  foi de 0,57 ( $s = 0,31$ ). Como todo o nitrato inserido e produzido foi removido do sistema, não foi possível calcular o índice estequiométrico dado pela razão entre  $[\text{NO}_3^-] / [\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+]$  (Figura 5.4).

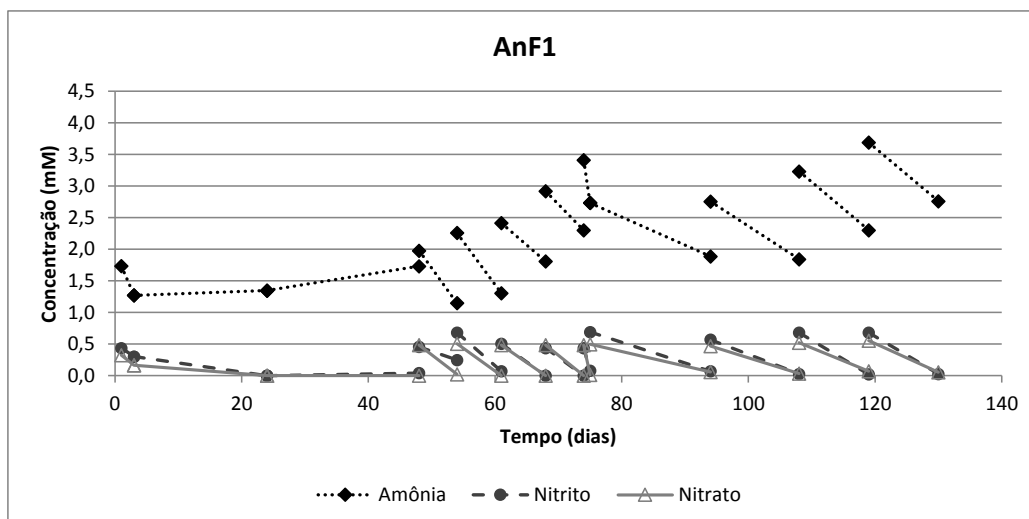


Figura 5.4: Desempenho dos sistemas biológicos com biomassa proveniente de lodo de lagoa anaeróbia tratando efluente de frigorífico 1, Araguari/MG (AnF1) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de bactérias anammox.

Da mesma maneira comportaram-se os sistemas biológicos com biomassa proveniente da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG (FaF1), tendo ocorrido possivelmente as conversões das formas nitrogenadas pelos processos anammox e desnitrificação heterotrófica, visto que ocorreram reduções nas concentrações de amônia, nitrito e nitrato (Figura 5.5). Nos sistemas com lodo da lagoa facultativa a razão média ( $\pm s$ ) entre  $[\text{NO}_2^-] / [\text{NH}_4^+]$  foi de 0,73 ( $s = 0,87$ ). A desnitrificação heterotrófica foi responsável pela remoção do nitrato do sistema e, por isso, não foi possível realizar cálculo do índice estequiométrico dado pela razão entre  $[\text{NO}_3^-] / [\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+]$ .

Nos sistemas biológicos com biomassa proveniente da lagoa facultativa do Frigorífico 2, Uberlândia/MG (FaF2) observou-se o acúmulo de nitrato a partir do 60º dia do início do desenvolvimento da biomassa indicando que, possivelmente, o processo anammox passa a predominar sobre o processo de desnitrificação heterotrófica (Figura 5.6). A partir desse momento cessou-se a introdução do substrato nitrato nos sistemas, uma vez que a finalidade da inserção foi reduzir a competição por substratos entre micro-organismos responsáveis

pelos metabolismos anammox e desnitrificação heterotrófica. Os índices estequiométricos dados pelas razões médias ( $\pm s$ ) entre  $[\text{NO}_2^-] / [\text{NH}_4^+]$  e entre  $[\text{NO}_3^-] / [\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+]$  foram de 0,73 ( $s = 0,87$ ) e 0,40 ( $s = 0,20$ ), respectivamente, e quanto mais próximos estiverem dos valores 1,32 e 0,28, respectivamente, melhor eficiência de conversão das formas nitrogenadas pelo metabolismo anammox.

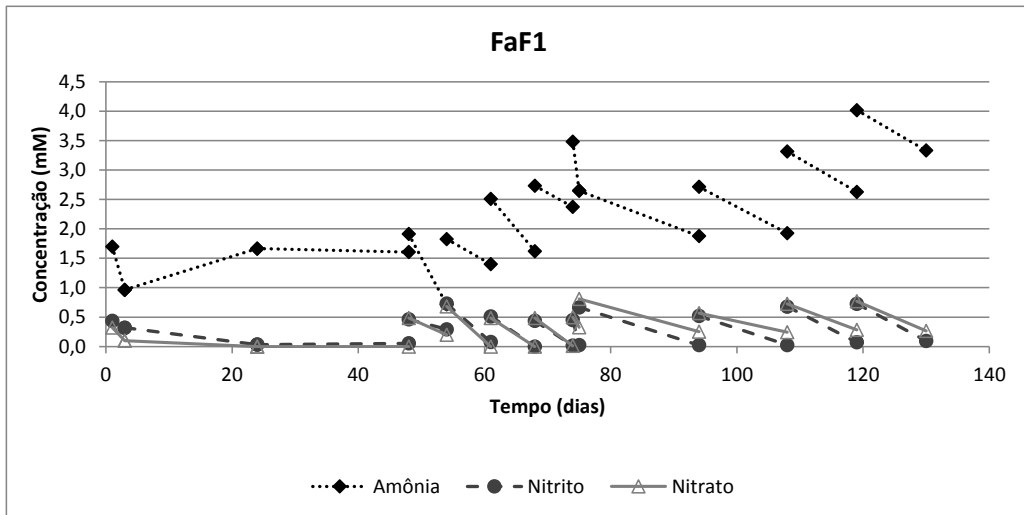


Figura 5.5: Desempenho dos sistemas biológicos com biomassa proveniente de lodo de lagoa facultativa tratando efluente de frigorífico 1, Araguari/MG (FaF1) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de bactérias anammox.

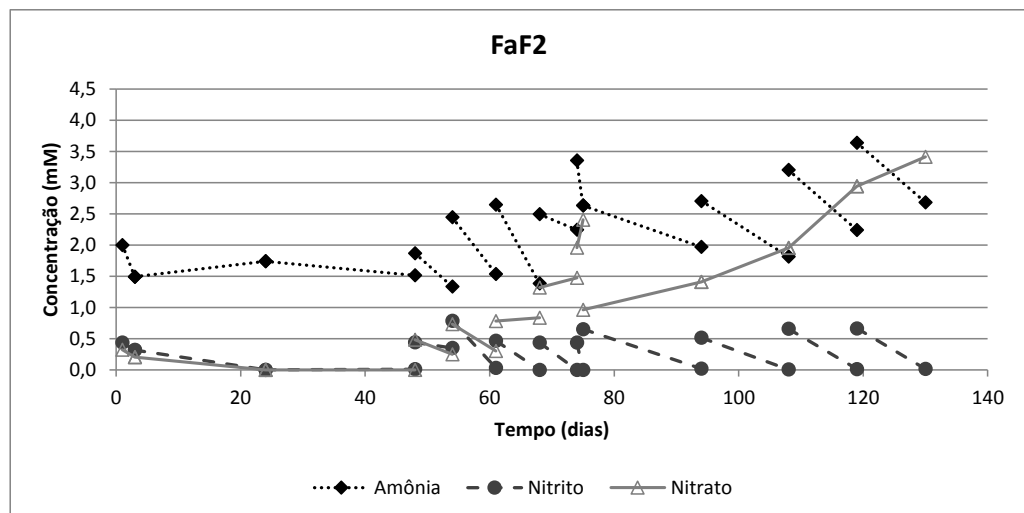


Figura 5.6: Desempenho dos sistemas biológicos com biomassa proveniente de lodo de lagoa facultativa tratando efluente de frigorífico 2, Uberlândia/MG (FaF2) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de bactérias anammox.

Os sistemas biológicos montados com biomassa proveniente do reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia/MG (UaF2) apresentaram a concomitância dos metabolismos conduzidos por micro-organismos responsáveis pelos processos anammox e de desnitrificação heterotrófica devido às reduções nas concentrações dos substratos amônia, nitrito e nitrato, tendo sido as formas nitrogenadas oxidadas removidas dos sistemas, dadas as concentrações abaixo do limite de detecção do método de análise (Figura 5.7). Dessa maneira, foi possível apenas calcular o índice estequiométrico dado pela razão ( $\pm s$ ) entre  $[\text{NO}_2^-] / [\text{NH}_4^+]$ , sendo de 0,72 ( $s = 0,73$ ).

Os sistemas biológicos montados com biomassa proveniente do sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília/DF (Cho) também se comportaram de forma semelhante aos sistemas biológicos AnF1, FaF1, UaF2 restringindo-se às comparações das conversões das formas nitrogenadas. Os processos anammox e a desnitrificação heterotrófica se destacaram dadas as reduções nas concentrações dos substratos amônia, nitrito e nitrato (Figura 5.8). Devido à utilização do substrato nitrato pelas bactérias desnitrificantes heterotróficas não foi possível calcular a razão entre  $[\text{NO}_3^-] / [\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+]$  para comparação com o índice estequiométrico dado pela reação anammox. No entanto, calculou-se a razão entre o consumo concomitante de nitrito e amônia por meio de  $\text{NO}_2^- / \text{NH}_4^+$ , sendo de 0,49 ( $s = 0,32$ ).

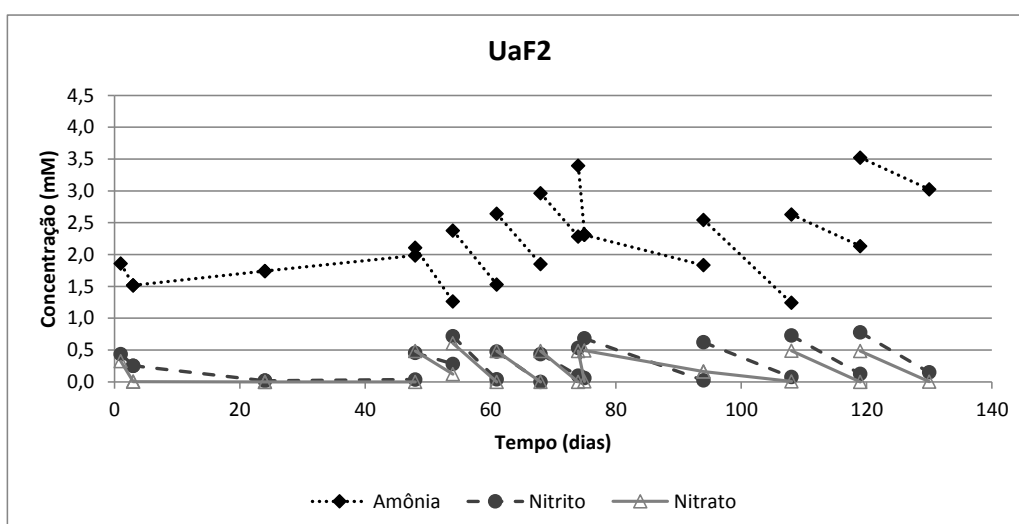


Figura 5.7: Desempenho dos sistemas biológicos com biomassa proveniente de lodo reator UASB tratando efluente de frigorífico 2, Uberlândia/MG (UaF2) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de bactérias anammox.

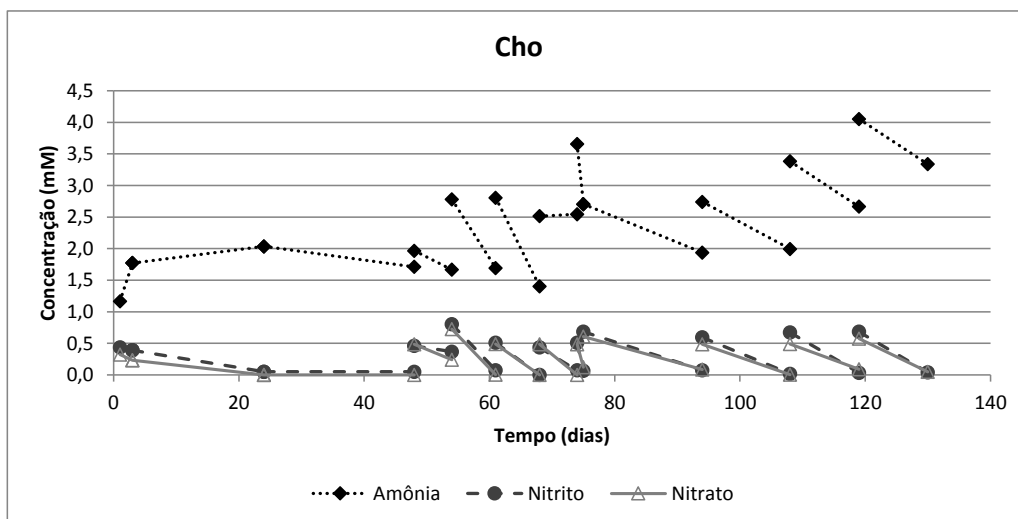


Figura 5.8: Desempenho dos sistemas biológicos com biomassa proveniente da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF (Cho) na conversão dos compostos nitrogenados durante a etapa 1 visando o enriquecimento de bactérias anammox.

A presença do carbono orgânico, quando da inserção dos inóculos, favoreceu grupos de bactérias heterotróficas, em especial as desnitrificantes, que demonstraram sua participação na remoção de nitrito e nitrato, em todos os sistemas biológicos testados e de forma acentuada naqueles sistemas inoculados com lodo do reator UASB tratando água residuária de abatedouro de bovinos e suínos do frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2). Provavelmente, a redução do sulfato com formação de sulfetos para os sistemas biológicos (UaF2) tenha interferido no metabolismo dos micro-organismos anammox. Os sulfetos formados são considerados substâncias inibidoras aos micro-organismos responsáveis pelo processo anammox (Jin *et al.*, 2012).

A desnitrificação heterotrófica inibe o processo anammox devido às alterações das concentrações dos substratos presentes no licor e no balanço químico modificando o tamponamento do licor (pH), além do mais as bactérias heterotróficas utilizam das formas oxidadas de nitrogênio competindo por nitrito com as bactérias anammox (Ni *et al.*, 2012).

De acordo com Tao *et al.* (2013), as bactérias anammox apresentam desvantagens competitivas com as bactérias heterotróficas, pois a reação anammox é termodinamicamente menos viável do que a reação de desnitrificação heterotrófica. Também, a síntese celular das bactérias heterotróficas é quase cinco vezes maior do que das anammox (Shen *et al.*, 2011).



Vários pesquisadores relataram o processo de desnitrificação heterotrófica predominando inicialmente nos sistemas para enriquecimento anammox devido à atmosfera anaeróbica e à presença de carbono e das formas oxidadas de nitrogênio necessárias para o metabolismo das bactérias desnitrificantes (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009; Araújo *et al.* 2010; Suneethi e Joseph. 2011; Wang *et al.* 2011).

Araújo *et al.* (2010), usando inóculo a partir de sistema de lodos ativados, registraram que a atividade desnitrificante foi exclusiva durante os primeiros 25 dias e concomitante ao processo anammox até o 87º dia, predominando então o processo anammox. Wang *et al.* (2011) usaram 3 fontes de inóculos para enriquecimento anammox em RBS e obtiveram sucesso apenas com o inóculo proveniente de um biorreator de membranas tratando água residuária sintética, com baixa relação C/N. Nos primeiros 19 dias apenas atividade desnitrificante foi registrada e permaneceu de forma menos acentuada até o dia 59º. O processo anammox ficou estável e predominante a partir do 60º dia. No trabalho desenvolvido por Sánchez-Melsió *et al.* (2009) apenas um inóculo, de 13 testados, demonstrou potencial atividade anammox depois de 3 meses. A atividade desnitrificante foi o único processo observado em todos os demais sistemas até um ano de monitoramento. Suneethi & Joseph (2011), usando lodo anaeróbico proveniente de biodigestor tratando resíduos de indústria de processamento de vegetais, registraram atividade anammox somente após 70 dias de cultivo, sendo que a estabilização do processo só foi verificada a partir de 140 dias.

Os sistemas biológicos Par e FaF2, cujas biomassas foram provenientes de sedimentos do lago Paranoá, Brasília, DF e de lodo de lagoa facultativa do Frigorífico 2, Uberlândia, MG, demonstraram potencial atividade anammox observando-se os registros de conversão dos compostos nitrogenados nos sistemas em bateladas e pela verificação de ampliações positivas, em análise de PCR, sugerindo a presença de organismos anammox. Nesses sistemas a atividade heterotrófica desnitrificante cessou rapidamente. As características da biomassa do sistema biológico Par com concentrações de carbono e relação C/N baixas devem ter favorecido as bactérias anammox desde o início do enriquecimento. No entanto, para os sistemas biológicos FaF2 somente após 60 dias é que se estabeleceu e predominou a atividade anammox. A diferença entre os dois sistemas, Par e FaF2, deve-se provavelmente às características químicas apresentadas pelos sistemas ambientais de onde foram coletados esses inóculos.

### 5.3.1.2 - Variações do pH do licor nos sistemas biológicos

De acordo com Li *et al.* (2012), a elevação no valor do pH de efluentes de reatores biológicos, ou seja, tornando-se mais básico, é um indicador efetivo do desempenho dos micro-organismos anammox.

As variações do pH do licor misto nos sistemas biológicos auxiliam no entendimento dos processos metabólicos predominantes, uma vez que os processos de nitrificação e nitratação consomem alcalinidade (Ahn, 2006) enquanto os processos anammox e de desnitrificação heterotrófica produzem alcalinidade (Sun *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Lackner *et al.*, 2012). Para cada 1,0 mg de nitrogênio amoniacal oxidado pela nitrificação aeróbia são necessários 7,07 mg de alcalinidade (Ahn, 2006), expressa como carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). A ocorrência conjunta de vários processos metabólicos pode assegurar uma menor oscilação do pH permitindo uma maior estabilidade dos sistemas biológicos garantindo com que este parâmetro operacional permaneça constante e dentro da faixa ótima para os micro-organismos responsáveis pelas conversões dos diferentes substratos.

As variações do pH ao longo das bateladas realizadas durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox estão apresentadas na Figura 5.9. As correções de pH ocorreram apenas quando da substituição do meio sintético ou quando atingiam valores menores do que 7, mas permanecendo sempre dentro da faixa ótima para a atividade anammox, entre 7,0 a 8,2. Em todos os sistemas biológicos durante os primeiros 60 dias, o pH do licor misto reduziu dos valores ajustados ao início das bateladas indicando o consumo da alcalinidade por processos metabólicos como nitrificação, redução de sulfato e consumo de carbono orgânico por bactérias heterotróficas (Figura 5.9 A a F). Ao final do período destinado ao enriquecimento da biomassa anammox (120 dias) registra-se uma menor oscilação dos valores de pH ajustados ao início das bateladas com uma tendência à elevação, provavelmente devido à predominância de processos metabólicos produtores de alcalinidade (Figura 5.9 A a F). O decaimento dos valores de pH foi mais acentuado nos sistemas biológicos com lodo proveniente do reator UASB (UaF2) tratando efluente do frigorífico 2 (Figura 5.9 E) provavelmente devido à redução do sulfato, detectada pela formação de fortes odores de gás sulfídrico (sulfetos) e pela remoção das concentrações de sulfato do licor misto.

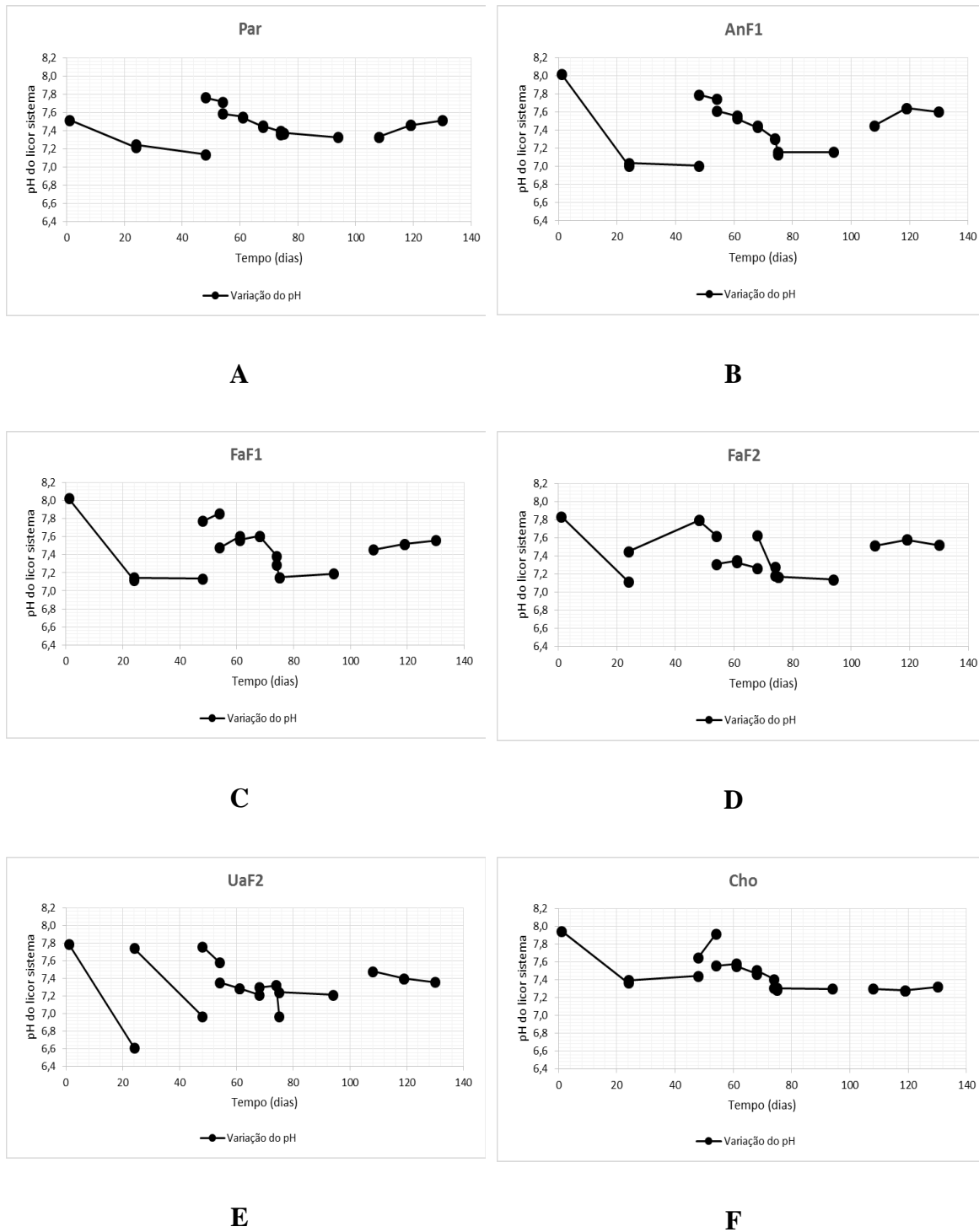


Figura 5.9: Variação do pH dos sistemas biológicos ao longo das bateladas durante a etapa 1 visando o enriquecimento da biomassa anammox. A) **Par**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; B) **AnF1**: lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; C) **FaF1**: lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; D) **FaF2**: lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; E) **UaF2**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; F) **CHOR**: sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF.

### 5.3.1.3 - Comportamento da biomassa quanto aos íons sulfato e fosfato

Dadas as concentrações iniciais de sulfato ( $4,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e de fosfato ( $17,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) inseridas nos sistemas biológicos a cada substituição do meio sintético, ocorreram comportamentos diferenciados na utilização desses componentes iônicos até 80 dias do início dos experimentos, sendo que os sistemas biológicos testados, à exceção daqueles inoculados com biomassa proveniente do reator UASB do Frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2), consumiram o fosfato presente e produziram sulfato, dados os processos metabólicos predominantes nos sistemas (Figuras 5.10 a 5.14).

Nos sistemas biológicos com biomassa a partir do sedimento do lago Paranoá, Brasília, DF (Par), ocorreu um aumento considerável das concentrações de sulfato ao longo das bateladas, quase 10 vezes maior o valor originalmente inserido no meio sintético. O fosfato é quase totalmente consumido nos primeiros 75 dias, quando a partir desse período as concentrações de fosfato e sulfato permanecem constantes (Figura 5.10).

A produção de sulfato sugere ocorrência de oxidação de sulfetos que pode promover consequências positivas para os sistemas biológicos visando a atividade anammox, primeiro porque reduz a presença de sulfetos que são inibitórios ao processo anammox (Jin *et al.*, 2012) e, segundo, porque consome oxigênio reduzindo a possibilidade deste ser utilizado na oxidação aeróbia de amônia e nitrito por bactérias aeróbias nitrificantes.

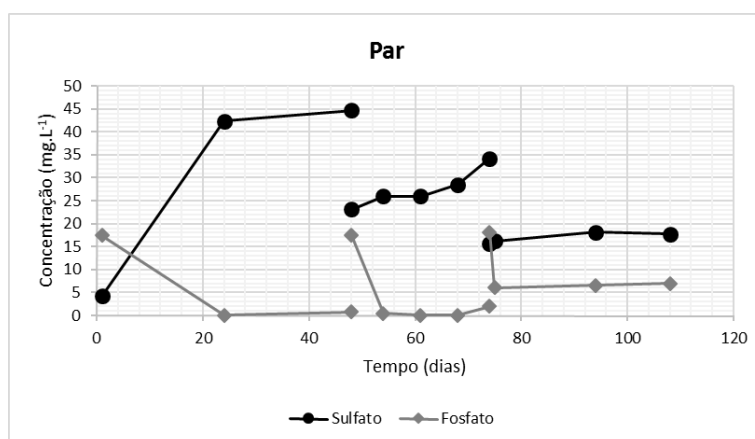


Figura 5.10: Concentrações dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com biomassa proveniente do sedimento do lago Paranoá, Brasília, DF (Par) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox.

Nos sistemas biológicos, com biomassa provenientes dos lodos das lagoas anaeróbia e facultativa tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG (AnF1 e FaF1), e da lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG (FaF2) as concentrações de sulfato aumentaram ao longo das bateladas, tendo variações de acordo com os sistemas em análise, atingindo concentrações 20 vezes maiores para os sistemas AnF1 e de 10 vezes maiores para os sistemas FaF1 e FaF2, do que aquelas introduzidas nesses sistemas quando da substituição da água residuária sintética. O fosfato foi, inicialmente, todo consumido pela biomassa em todos os sistemas em análise, sendo que após o período de 80 dias de enriquecimento, as suas concentrações permaneceram relativamente constantes, em torno de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . O sulfato, mesmo após um período maior de tempo, continuou sendo produzido, elevando-se para patamares entre  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  (FaF1 e FaF2) e  $45 \text{ mg.L}^{-1}$  (AnF1) (Figuras 5.11 a 5.13).

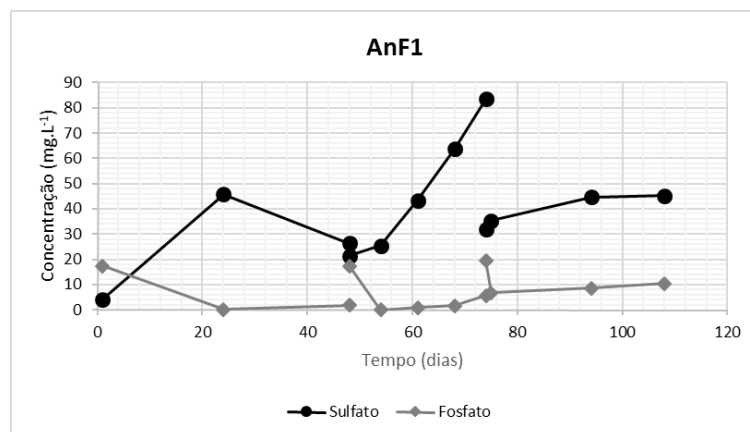


Figura 5.11: Concentrações dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com biomassa proveniente do lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG (AnF1) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox.

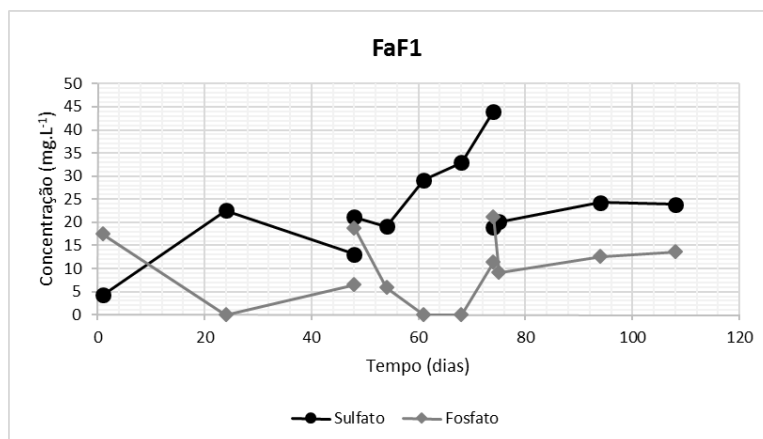


Figura 5.12: Concentrações dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com biomassa proveniente do lodo da lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG (FaF1) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox.

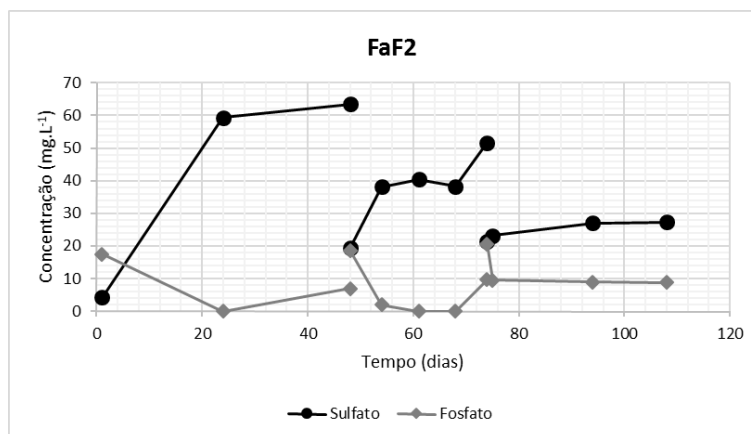


Figura 5.13: Concentrações dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com biomassa proveniente do lodo da lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG (FaF2) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox.

Nos sistemas biológicos com biomassa a partir do lodo proveniente do reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia/MG (UaF2) foi possível constatar a ocorrência de processos metabólicos conduzidos por bactérias redutoras de sulfato, dado a formação de gases sulfídricos ( $H_2S$ ) detectados pelos odores quando da operação dos sistemas. As concentrações de sulfato presentes no meio sintético foram significativamente reduzidas pela ocorrência desse processo metabólico redutor de sulfato (Figura 5.14).

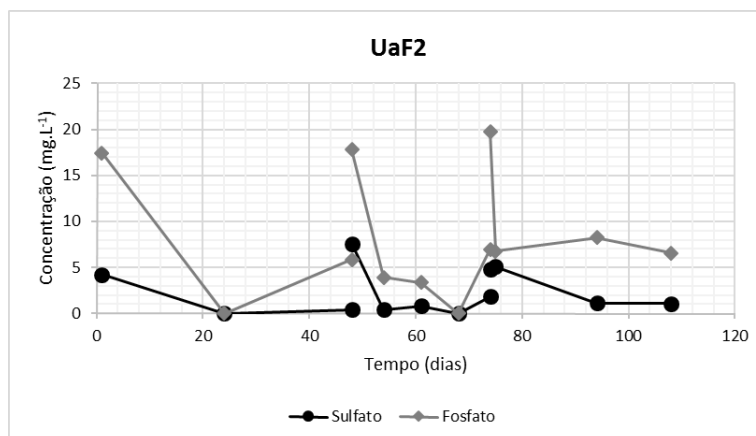


Figura 5.14: Concentrações dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com biomassa proveniente do reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox.

De acordo com Fdz-Polanco *et al.* (2001), as bactérias redutoras de sulfato, em condições anaeróbias, usam esse ânion como acceptor final de elétrons para degradação de compostos orgânicos e hidrogênio com formação de sulfetos dissolvidos no licor e ou liberação de gases sulfídricos. Foi demonstrado, experimentalmente, que sulfato em condições anaeróbias, juntamente com o nitrito, nitrato e propionato, pode ser um oxidante adequado para conversão anaeróbia da amônia conduzida por micro-organismos como as bactérias do grupo Planctomycetales, sendo sugerido como responsável “*Candidatus Anammoxoglobus sulfate*” (Liu *et al.*, 2008). A conversão anaeróbia da amônia tendo o sulfato como acceptor de elétrons ocorre com formação do intermediário nitrito e assim, os substratos amônia e nitrito estão disponíveis para a oxidação da amônia a nitrogênio gasoso (Li *et al.*, 2008). Esse processo de remoção anaeróbia da amônia tendo o sulfato como acceptor final de elétrons havia sido previsto por Fdz-Polanco *et al.* (2001).

Ocorreram reduções nas concentrações de fosfato do licor misto, tendo sido pronunciadas as reduções nas bateladas conduzidas até 70 dias, sem detecção de fosfato dissolvido no licor misto dos sistemas biológicos (UaF2). Após esse período inicial, registra-se a redução das concentrações próximas a 20 mg.L<sup>-1</sup> para 7,5 mg.L<sup>-1</sup> permanecendo-se constante nessa faixa.

Os sistemas biológicos inoculados com sedimento proveniente da lagoa de acumulação de chorume do aterro Jockey Clube de Brasília, DF (Cho) também se diferenciaram dos demais sistemas devido à maior produção de sulfato durante as bateladas que ocorreram entre os dias 45 e 65, tendo atingindo concentrações 24 vezes maiores do que as inseridas nos

sistemas quando da substituição da água residuária sintética, tendo continuado a produção nas bateladas seguintes até os 120 dias de monitoramento, relativos à fase inicial de enriquecimento da biomassa para atividade anammox. Nesses sistemas biológicos, o consumo total de fósforo também foi observado, mesmo para períodos maiores do que os primeiros 80 dias (Figura 5.15).

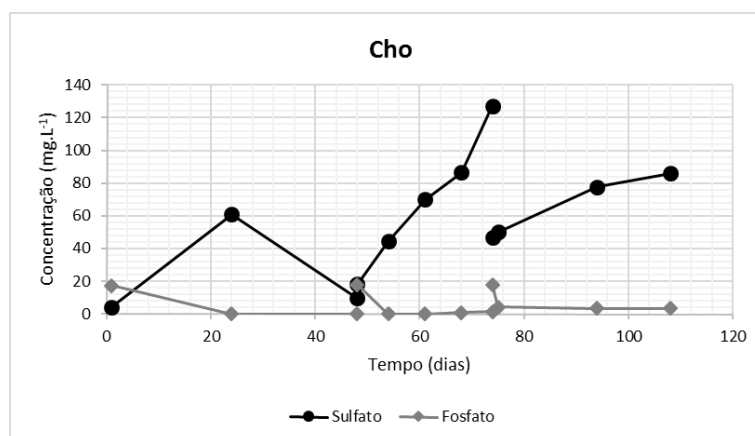


Figura 5.15: Concentração dos íons sulfato e fosfato nos sistemas biológicos com biomassa proveniente da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília, DF (Cho) durante a etapa 1 visando o enriquecimento de micro-organismos anammox.

Registra-se que nos demais sistemas biológicos como Par, AnF1, FaF1 e FaF2 as concentrações de fosfato, após o período de 80 dias do início dos experimentos, permaneceram relativamente constantes, em torno de 10 mg.L<sup>-1</sup>.

Outras substâncias iônicas presentes no meio podem também interferir para o sucesso da biomassa presente. A sedimentação do lodo em sistemas de tratamento pode ser favorecida quando a água residuária tratada apresenta concentrações elevadas de cloreto de sódio, como demonstrado por Fernández *et al.* (2008). Dessa maneira, devido às características da água residuária sintética utilizada nos sistemas biológicos testados, as concentrações de cloreto de sódio foram sempre maiores do que 200 mg.L<sup>-1</sup>, o que pode ter ajudado a garantir a manutenção da biomassa anammox nos sistemas.



#### 5.3.1.4 - Caracterização da biomassa nos sistemas biológicos após 120 dias

Avaliou-se a biomassa dos sistemas biológicos, por PCR convencional e quantitativa, utilizando *primers* específicos ao grupo Planctomycetales e aos nitrificantes aeróbios, após um período de 120 dias do início dos experimentos, tendo os sistemas sido operados conforme as condições estabelecidas para a 1ª etapa. A amplificação positiva de fragmentos de DNA de tamanhos esperados sugere a presença dos micro-organismos de interesse e, assim, a inferência dos processos metabólicos predominantes nos sistemas biológicos testados.

Após extração do DNA da biomassa, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) e estimou a concentração total do DNA genômico usando-se o marcador molecular *High Mass Ladder* (Invitrogen, USA), obtendo-se um volume final de 100  $\mu\text{L}$  em concentrações entre  $5 \text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  a  $35 \text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  (Apêndice III - CD).

Nas análises por PCR usando os mesmos *primers* para os genes que codificam o RNAr 16S de bactérias anammox e as mesmas condições anteriormente testadas para os inóculos, foi possível observar ampliações positivas para fragmentos de aproximadamente 774 pb nos sistemas biológicos, à exceção dos sistemas UaF2 (Tabela 5.7) (Apêndice III - CD).

Para os *primers* Pla 46F e Amx 820R, os sistemas com lodos provenientes do sedimento do lago Paranoá (Par) e da lagoa facultativa do frigorífico 2 (FaF2) resultaram em melhores respostas de amplificação antes e depois do período destinado para enriquecimento (Tabela 5.7). Ocorreu amplificação positiva usando esse conjunto de *primers* para a biomassa dos sistemas biológicos com sedimento da lagoa de acumulação de chorume de Brasília, DF (Cho), indicando que a falta de amplificação no início do experimento pode ser devida às concentrações iniciais e limite de detecção da técnica de análise, bem como a mudança de dominância das espécies presentes. A ausência de resultados positivos nas ampliações para os sistemas biológicos com lodo do reator do UASB do frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2), após o período destinado ao enriquecimento, pode indicar a exclusão de algumas espécies candidatas anammox do sistema. Pode-se também supor que o conjunto de *primers* utilizados (Pla 46F e Amx 820R), desenhados para ampliações de fragmentos de genes que codificam o RNAr 16S para organismos relacionados à “*Candidatus Brocadia*” e “*Ca. Kuenenia*”, não foi satisfatório para amplificação de outras bactérias presentes pertencentes ao grupo de anammox.

Tabela 5.7: Resultados de ampliações por PCR usando par de *primers* Pla 46F e Amx 820R, nos diferentes lodos antes e após o período para enriquecimento anammox.

Sistema	Inóculo	Após 120 dias
<b>Par</b>	+	+
<b>AnF1</b>	+/-	+/-
<b>FaF1</b>	+/-	+
<b>FaF2</b>	+	+
<b>UaF2</b>	+/-	-
<b>Cho</b>	-	+/-

(+) Resultados positivos para os produtos amplificados na PCR visualizados no gel de agarose 1%; (+/-) Resultados positivos com fragmentos amplificados visualizados sem nitidez no gel de agarose. **Sistemas:** **Par:** sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1:** lodo de lagoa anaeróbia tratando do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1:** lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2:** lodo da lagoa facultativa do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **UaF2:** lodo de reator UASB tratando de efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **Cho:** sedimento de lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Club/DF. Apêndices I e III

Da mesma maneira, utilizando-se da análise de PCR, foi levantada a possibilidade da presença de micro-organismos nitrificantes aeróbios pois representam potenciais parceiros e/ou competidores das bactérias anammox, visto que utilizam os substratos amônia e nitrito. O primeiro grupo analisado foi das bactérias aeróbias oxidadoras de amônia, representadas por bactérias como *Nitrosomonas*, por meio da utilização do par de *primers amoA* direto e reverso (Egli, 2003). As ocorrências de fragmentos de aproximadamente 650 pb esperados para essa amplificação foram apenas para os sistemas biológicos com inóculo proveniente da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília, DF (Cho A e B), tendo ocorrido também a formação de fragmentos não específicos para os demais sistemas (Apêndice III - CD).

O segundo grupo analisado foi das bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito, representadas por bactérias como *Nitrobacter*, por meio da utilização dos *primers Nitro 1198* direto e *Nitro 1423* reverso (Graham *et al.*, 2007), formando fragmentos de aproximadamente 225 pb em todos os sistemas biológicos testados. Ainda que as condições estabelecidas nos sistemas não devessem favorecer esse grupo de bactérias, supõe-se que elas mantiveram ao longo do período para enriquecimento anammox e provavelmente atuaram como competidoras pelo substrato nitrito com as bactérias anammox (Apêndice III - CD).

A avaliação dos resultados da PCR quantitativa permitiu indicar a representatividade de cada um dos três grupos de micro-organismos: os anammox, os nitrificantes aeróbios de amônia (como *Nitrosomonas*) e os nitrificantes aeróbios de nitrito (como *Nitrobacter*) no total do

DNA genômico extraído a partir da biomassa de cada um dos sistemas biológicos. A concentração de cópias de DNA do fragmento amplificado usando os *primers* específicos, no momento que se tem o valor de C<sub>q</sub>, foi o parâmetro de medida utilizado para comparações das comunidades biológicas dos sistemas. Esse parâmetro é construído pela estimativa comparada e relativa das concentrações de DNA de cada amostra a uma curva referência (Bustin *et al.*, 2009). Os resultados foram apresentados como concentração de cópias em nanograma de DNA por mililitro ( $\text{ng.mL}^{-1}$ ) numa escala logarítma, sendo os dados para cada grupo de micro-organismo colocados empilhados e após a diminuição das proporções de densidades de cópias de DNA dos envolvidos no ciclo do nitrogênio do total calculado para o Domínio *Bacteria*.

Os micro-organismos como *Nitrobacter* destacam-se nas amostras de DNA genômico de todos os sistemas ambientais (Figura 5.16). Quando da inoculação nos sistemas biológicos, na avaliação da densidade do número de cópias, os micro-organismos anammox e os nitratantes aeróbios como *Nitrobacter* apresentavam-se em densidades próximas para os sistemas Par, AnF1, FaF1 e FaF2 (Figura 5.16). A densidade do número de cópias obtida com o uso do *primer* universal, para amplificação de fragmentos de genes para o RNAr 16S do Domínio *Bacteria*, resultou em aumento significativo na densidade total para os sistemas Par, AnF1, FaF1 quando comparadas à biomassa dos inóculos (Figura 5.16).

Os inóculos utilizados para compor os sistemas biológicos divergiram em concentrações de cópias de DNA para o Domínio *Bacteria*, sendo que as maiores concentrações de cópias registradas foram em ordem crescente para os inóculos provenientes da lagoa de acumulação de chorume do aterro JK, Brasília, DF (Cho) e dos provenientes do reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2) (Figura 5.16). Os demais inóculos utilizados nos sistemas biológicos apresentaram concentrações de cópias de DNA de 1 a 2 ordens de grandeza menor do que os inóculos Cho e UaF2. Sendo, em sequência, aqueles com maior concentração de cópias: lodo de lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG (FaF2); lodos provenientes da lagoa facultativa (FaF1) e lagoa anaeróbia (AnF1) tratando efluente do frigorífico 1, Araguari e MG sedimento do lago Paranoá, Brasília, DF (Pa) (Figura 5.16).

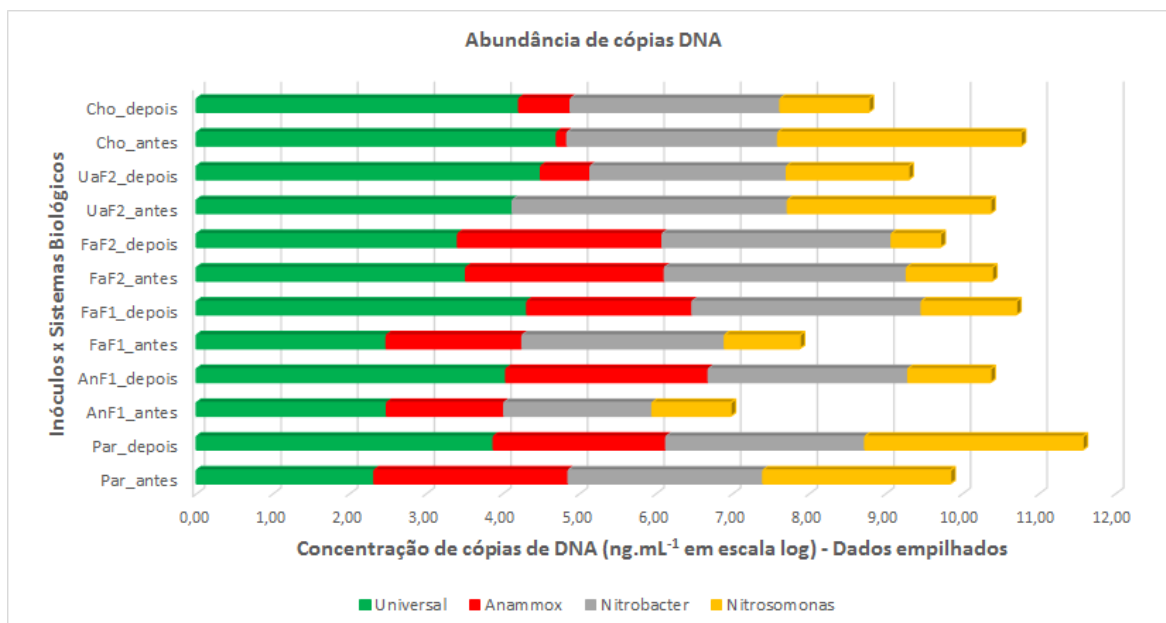


Figura 5.16: Abundância de cópias dos genes de micro-organismos de interesse, usando quatro pares de *primers*, para levantamento do número de cópias de DNA de organismos relacionados ao Domínio *Bacteria*, bactérias anammox, oxidadoras aeróbias de nitrito e amônia, dados em escala logarítmica e empilhados. **Par**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1**: lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1**: lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2**: lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **CHOR**: sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF.

Observa-se que os inóculos provenientes do sedimento lago Paranoá, Brasília, DF (Pa) e dos lodos provenientes de lagoas facultativas tratando efluente de frigoríficos (FaF1 e FaF2), apresentaram uma distribuição mais equitativa entre os grupos de bactérias relacionadas ao ciclo do nitrogênio, podendo resultar em melhor equilíbrio competitivo entre as bactérias para consumo dos íons nitrogenados presentes (Figura 5.16).

Constata-se que a abundância do número de cópias das bactérias analisada pelo uso dos *primers* universais para o gene RNAr 16S do Domínio *Bacteria* aumentou em ordem de 1 a 2 grandezas para os sistemas biológicos provenientes do sedimento do Lago Paranoá (Par), do lodo da lagoa anaeróbia e facultativa do Frigorífico 1 (AnF1, FaF1). Nos demais sistemas, a abundância do número de cópias permaneceu constante, na mesma unidade de grandeza (Figuras 5.16). As condições estabelecidas para operação dos sistemas biológicos, em modo de culturas em bateladas ajustadas para o enriquecimento de organismos anammox, determinaram os micro-organismos que permaneceram nos sistemas. As condições definiram variações na abundância de cada um dos grupos de micro-organismos em

decorrência da eficiência competitiva em situações de limitação dos substratos, especialmente de fonte externa de carbono orgânico e nitrito, necessários ao metabolismo das bactérias.

A partir da análise dos resultados obtidos pela PCRq, para a primeira etapa experimental (120 dias), observou-se aumento nas concentrações de cópias de DNA para os micro-organismos anammox nos AnF1A e FaF1, bem como nos sistemas UaF2 e Cho (Figura 5.17). Depreende-se que processos metabólicos como os de desnitrificação heterotrófica, oxidação de sulfetos, redução de sulfatos e nitrificação, bem como o tempo necessário para aclimatação dos micro-organismos podem ter contribuído para o relativo aumento nas concentrações de cópias das bactérias anammox, visto que, o consumo de substratos e formação de substâncias inibidoras limitam o seu desenvolvimento.

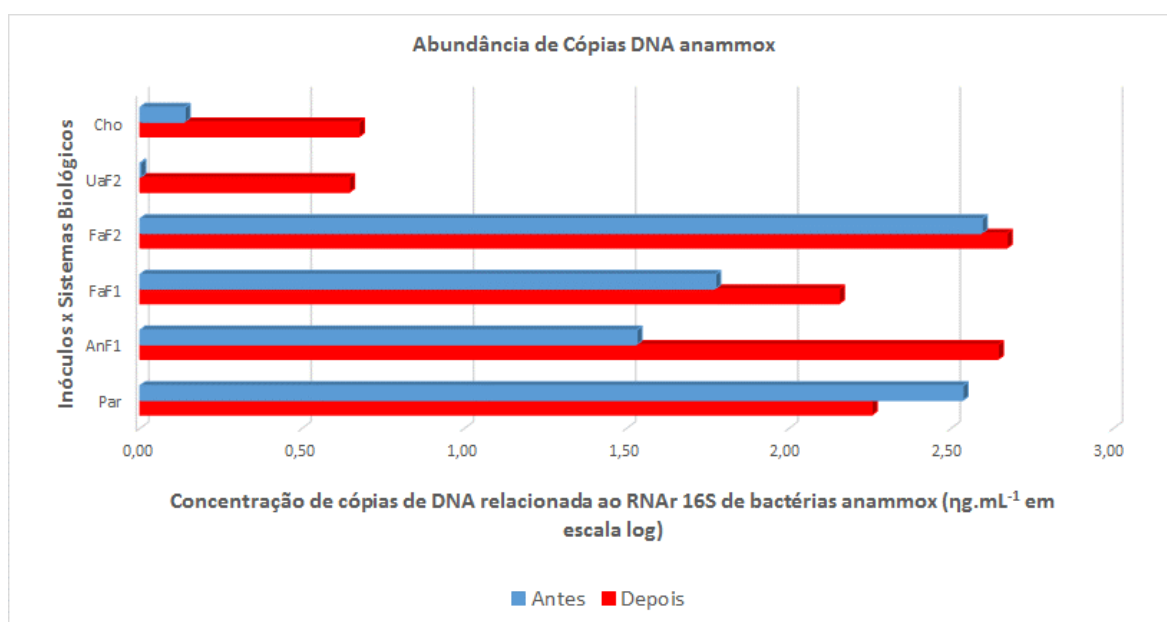


Figura 5.17: Concentrações de cópias de DNA relacionadas ao RNAr 16S de bactérias anammox nos sistemas biológicos antes e após o período de 120 dias com condições ajustadas para o desenvolvimento de micro-organismos anammox.

Outra possível explicação para a concentração do número de cópias de fragmentos dos genes relacionados ao RNAr 16S para bactérias anammox terem permanecidas relativamente constantes é a substituição de dominância da espécie anammox originalmente presentes nos inóculos por outra espécie candidata dadas as condições estabelecidas para os sistemas e,

também, devido a interações competitivas e cooperativas com outros grupos de bactérias, constatação também feita por Hu *et al.* (2010). Park *et al.* (2010) registraram a substituição de dominância de espécie, após o período de enriquecimento, daquelas bactérias originalmente presentes nos inóculos.

Em observações prévias em comunidades de biorreatores notaram a mudança na dominância de “*Ca. Kuenenia*” para “*Ca. Scalindua*” depois de 360 dias para o enriquecimento em meio com altas concentrações de sais (Kartal *et al.*, 2006). Em sistemas com variações nas concentrações de nitrito ocorreram mudanças nas comunidades biológicas, inicialmente com dominância de “*Ca. Brocadia*” para “*Ca. Kuenenia*” devido às diferenças na afinidade por  $\text{NO}_2^-$  (van der Star *et al.*, 2008). Da mesma forma, Nakajima *et al.* (2008) registraram modificações de dominância de comunidade de biorreatores, tendo-se “*Ca. Scalindua*” substituída por “*Ca. Brocadia*” e “*Ca. Kuenenia*”.

As análises das sequências do DNA dos fragmentos obtidos utilizando-se os pares de *primers* Pla46F e Amx820R indicam que as espécies de bactérias anammox presentes na biomassa antes e após o período destinado ao enriquecimento diferiram significativamente (Figura 5.18).

Há uma divergência menor do que 2% entre as sequências de DNA relacionadas ao RNAr 16S para o grupo anammox comparando-se as biomassas dos diferentes inóculos mesmo sendo estes de origens bastante distintas. As condições ambientais nos habitats de onde foram coletados os inóculos, tais como baixas concentrações de oxigênio dissolvido, temperatura mesofílicas, pH próximos a 7, sugerem que interações entre os membros das comunidades microbiológicas não sejam significativamente diferentes (Figura 5.18). Além do mais, os fragmentos de DNA amplificados e sequenciados a partir dos *primers* Pla46F e Amx820R podem ser resultado da espécie dominante nos sistemas. Divergências menores que 2% podem indicar espécies dentro do mesmo gênero (Rosselló-Mora e Amann, 2001; Kartal *et al.*, 2007).

A partir da análise do dendrograma constata-se que as sequências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA para as bactérias anammox presentes originalmente nos inóculos divergiram em quase 10% em posições dos nucleotídeos quando comparadas com as sequências obtidas a partir dos DNAs para as bactérias anammox nas biomassas dos sistemas biológicos, após 120 dias de operação, com condições ajustadas para o enriquecimento do

grupo anammox (Figura 5.18). De acordo com Kartal *et al.* (2007) ocorrem grandes diferenças nas distâncias filogenéticas entre distintas espécies membros dos Planctomycetales. Dessa maneira, os resultados obtidos até essa etapa experimental sugerem a substituição das populações de bactérias anammox, estabelecidas as condições operacionais dos sistemas biológicos que foram diferentes das condições ambientais dos habitats de onde os inóculos foram coletados. Dessa forma, pressupõe-se que concentrações de cópias de DNA, relacionadas ao RNAr 16S para o grupo anammox, permaneceram relativamente constantes devido à essa substituição de espécies anammox. São necessários períodos longos de tempo, sob dadas condições, para que ocorra o estabelecimento das populações em abundância para sobrepujarem-se nas comunidades biológicas e, assim apresentarem vantagens competitivas sobre espécies de micro-organismos concorrentes por substratos.

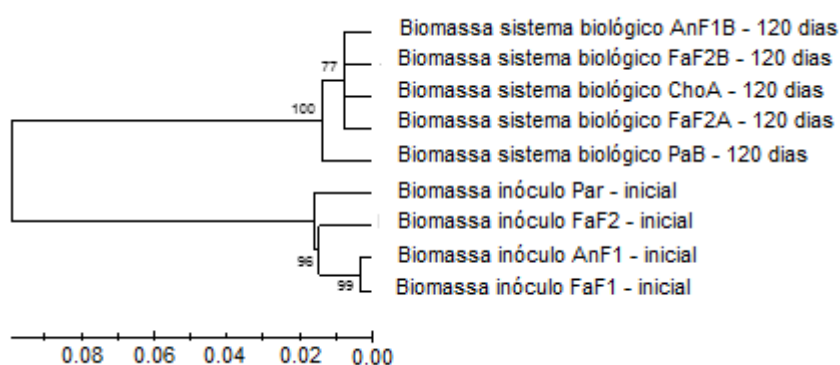


Figura 5.18: Dendrograma comparativo da similaridade filogenética das biomassas obtidas a partir dos inóculos e dos sistemas biológicos após 120 dias em condições ajustadas para ocorrência do enriquecimento dos micro-organismos anammox. O dendrograma foi gerado usando fragmentos de 720 pb do gene RNAr 16S, usando os primers Pla46F e Amx820R.

Os valores presentes nos nós da árvore indicam a porcentagem de vezes que os ramos se repetiram em 1000 análises de re-amostragens (*Bootstrap*). A barra de escala representa a diferença estimada nas posições dos nucleotídeos entre as sequências (Apêndice IV – CD).

Independentemente da origem dos inóculos, ocorreu uma convergência das candidatas espécies anammox entre os sistemas biológicos, sugerindo que a pressão seletiva imposta pelas condições operacionais estabelecidas foi determinante para a prevalência de dada candidata (Figura 5.18). As sequências obtidas para os sistemas biológicos com biomassas provenientes das lagoas facultativas tratando efluentes dos frigoríficos 1 e 2 (FaF1) e (FaF2),

da lagoa anaeróbia tratando efluente do frigorífico 1 (AnF1) e da lagoa de acumulação de chorume do aterro JK (Cho) apresentaram similaridades maiores do que 99% e as sequências obtidas a partir do DNA da biomassa dos sistemas biológicos proveniente do sedimento do lago Paranoá, Brasília, DF (Pa) diferiram apenas em 0,5% destas sequências obtidas nos sistemas FaF1, FaF2, AnF1 e Cho (Figura 5.18).

A avaliação da abundância de cópias de DNA, relacionada ao RNAr 16S, para os micro-organismos como *Nitrobacter* foi realizada porque esse grupo é um importante competidor pelo substrato nitrito (Figura 5.19). As concentrações de cópias de DNA para os organismos como *Nitrobacter* reduziram nos sistemas biológicos com biomassa do reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2) após o período de 120 dias (Figura 5.19). No sistema biológico UaF2 as concentrações de carbono orgânico, originalmente presentes no inóculo, favoreceram grupos de micro-organismos heterotróficos, visto que, todo o nitrito e nitrato inicialmente inseridos nos sistemas foram rapidamente consumidos. Dessa maneira, a limitação de substrato nitrito aliada às concentrações baixas de oxigênio dissolvido podem ter determinado as reduções nas concentrações de cópias de DNA para *Nitrobacter* (Figura 5.19). Deve-se analisar a utilização de determinadas fontes de carbono orgânico para partidas de sistemas visando atividade anammox pois apresenta-se como estratégia na redução das concentrações das bactérias como *Nitrobacter* dos sistemas.

Diferentemente, os sistemas biológicos montados com biomassa proveniente do sistema de tratamento de efluentes do frigorífico 1, Araguari, MG (AnF1 e FaF1) resultaram num aumento das concentrações de cópias de DNA relacionadas aos micro-organismos como *Nitrobacter* (Figura 5.19). Esse acréscimo significa uma maior população de micro-organismos nitratantes aeróbios competindo pelo substrato nitrito e, tornando-o limitante nos sistemas para a atividade anammox.



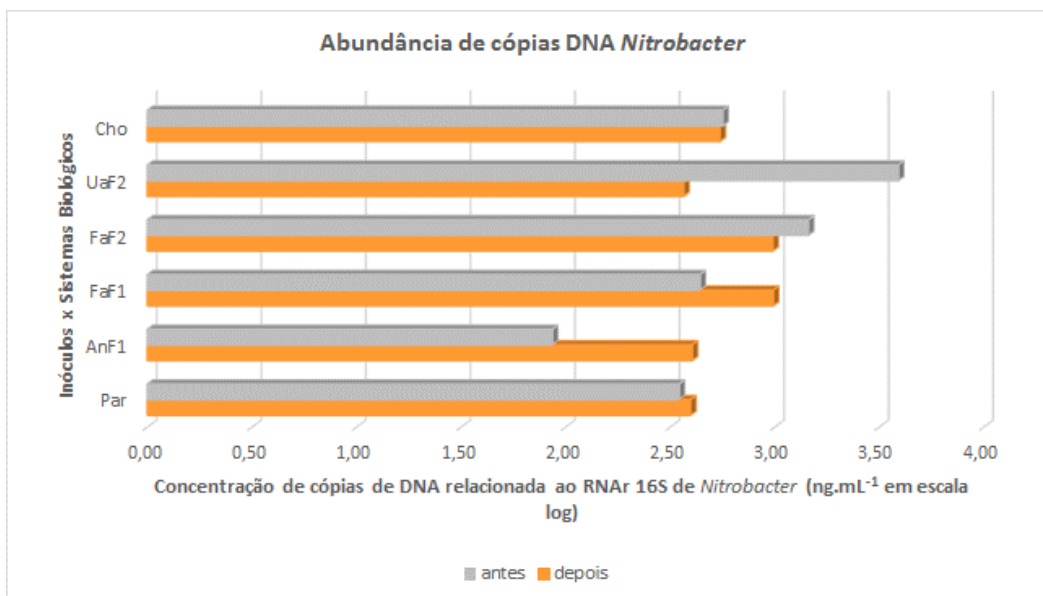


Figura 5.19: Concentrações de cópias de DNA relacionadas ao RNAr 16S de bactérias como *Nitrobacter* nos sistemas biológicos antes e após o período de 120 dias com condições ajustadas para o desenvolvimento de micro-organismos anammox.

#### 5.3.1.5 - Afiliações filogenéticas por comparações às sequências anammox depositadas no GenBank

Foram realizadas afiliações filogenéticas entre as sequências de DNA obtidas da biomassa dos inóculos provenientes do sedimento do lago Paranoá, Brasília, DF (Par), dos lodos das lagoas anaeróbia e facultativas tratando efluente de Frigorífico 1 e 2 (AnF1, FaF1 e FaF2) e da biomassa dos sistemas biológicos Par (sedimento lago Paranoá); AnF1 (lodo da lagoa anaeróbia), FaF2 (lodo da lagoa facultativa) e Cho (lagoa acumulação de chorume), após 120 dias do início das bateladas com sequências das candidatas a espécies anammox depositadas no *GenBank*. Comparou-se, também, com grupos externos tais como aqueles representantes da Ordem Planctomycetales que não possuem habilidade metabólica de oxidar a amônia usando o nitrito como acceptor de elétrons e com uma espécie pertencente ao Filo Verrucomicrobia (Figura 5.20).

Os fragmentos utilizados para o sequenciamento e posteriores comparações filogenéticas foram obtidos pela amplificação dos genes relacionados ao RNAr 16S usando-se os *primers* Pla46F (Neef *et al.*, 1998) e Amx 820R (Schmid *et al.*, 2000). As sequências utilizadas nas comparações foram somente as decorrentes dos inóculos e/ou sistemas biológicos que

resultaram em sequências com boa qualidade avaliadas pelo *Sequence Scanner* (*Applied Biosystems*, USA), visto que, como não foi realizada clonagem, buscou-se pela qualidade resultante do sequenciamento (Apêndice IV - CD).

As sequências resultantes dos fragmentos de DNA amplificados da biomassa dos inóculos e dos sistemas biológicos após 120 dias diferiram em aproximadamente 12,5% formando dois ramos filogeneticamente diferentes (Figura 5.20), sugerindo a substituição da espécie antes dominante no inóculo para outra espécie com o estabelecimento das condições operacionais dos sistemas. Da mesma maneira, esses dois *clusters* diferiram do cluster associado ao grupo das bactérias candidatas anammox, ou seja, apresentando apenas 87,5% de similaridades entre as sequências de nucleotídeos comparados.

As diferenças registradas entre as sequências das candidatas a espécies anammox também são consideráveis. Diferenças em torno de 5% resultam em vários *clusters* e, assim separados em diferentes gêneros anammox (Figura 5.20). Diferenças filogenéticas acentuadas têm sido consideradas como ocorrentes entre os membros pertencentes aos Planctomycetales (Kartal *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2010). De acordo com Rosselló-Mora e Amann (2001), a análise de sequências dos genes que codificam o RNAr 16S é útil para quando se pretende definir ordens de agrupamentos superiores à espécie, apresentando que sequências com similaridade acima de 95% podem ser definidas dentro do mesmo gênero.

Constata-se dois ramos dentro das candidatas anammox que se diferenciaram em mais de 8% separando os “*Candidatus* Kuenenia e Scalindua” de “*Ca.* Brocadia, Jettenia e Anammoxoglobus” (Figura 5.20). Dessa maneira, tendo as distâncias filogenéticas obtidas por comparações dos genes para o RNAr 16S como critério para agrupamento conforme discutido por Rosselló-Mora e Amann (2001), sugere-se que as sequências obtidas nesse estudo apresentam similaridade suficiente (88,5%) com as sequências das candidatas anammox e, por isso foram consideradas como possíveis membros da Ordem dos microorganismos capazes de oxidar a amônia sob condições anóxicas. Bae *et al.* (2010), reuniram 26 clones como um *cluster* de supostas anammox, visto que apresentaram em média 79,5% de similaridade com “*Ca.* Jettenia asiatica”, “*Ca.* Brocadia fulgida”, “*Ca.* Brocadia anammoxidans”, “*Ca.* Kuenenia stuttgartiensis”, “*Ca.* Anammoxoglobus propionicus” e “*Ca.* Scalindua brodae”.

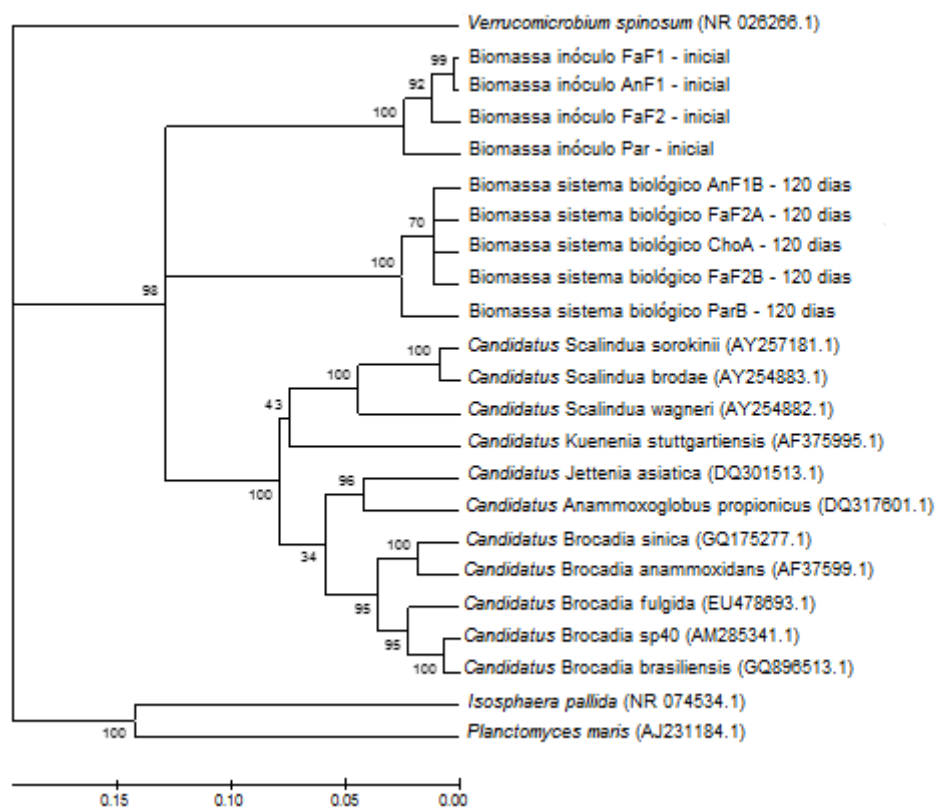


Figura 5.20: Dendrograma mostrando a afiliação filogenética das sequências obtidas a partir da biomassa dos inóculos e dos sistemas biológicos após 120 dias com sequências depositadas no *GenBank* a partir dos códigos para as candidatas a espécies anammox. O dendrograma foi gerado usando fragmento de 720 pb do gene RNAr 16S, usando os iniciadores Pla46F e Amx820R. Os valores presentes nos nós da árvore indicam a % de vezes que os ramos se repetiram em 1000 análises de re-amostragens. A barra de escala representa a diferença estimada nas posições dos nucleotídeos entre as sequências.

Foi proposto classificar as bactérias anammox, capazes de oxidar a amônia usando o nitrito como aceptor de elétrons, na Ordem *Candidatus* Brocadiales separando-as daquelas bactérias sem habilidade anammox pertencentes à Ordem Planctomycetales (Schmid *et al.*, 2001; Kuypers *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2003; Woebken *et al.*, 2008; Quan *et al.*, 2008; Kartal *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2011).

Quando comparadas as sequências com aquelas das espécies pertencentes a ordem Planctomycetales, tais como *Isosphaera pallida* e *Planctomyces maris*, tanto as sequências obtidas nesse estudo quanto aquelas relacionadas às espécies candidatas ao grupo anammox tiveram, igualmente, uma similaridade de apenas 80% (Figura 5.20). Assim, sugere-se que os *clusters* formados pelas sequências desse estudo estão mais relacionados ao *cluster* do

grupo das candidatas às espécies anammox do que das espécies sem a habilidade metabólica de oxidar anaerobicamente a amônia, pertencentes à ordem Planctomycetales.

Foi realizada uma avaliação das afiliações filogenéticas comparando-se cada sequência desse estudo com sequências depositadas no *GenBank* que tiveram similaridades elevadas (*Max. Ident.* e *Query Coverage* acima de 95 %) calculadas pela ferramenta *BLAST*. Dessa maneira, selecionou-se um conjunto de 13 sequências que foram originadas de estudos em vários países (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009; Kalyuzhnyi *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; e outras ainda não publicadas em artigos). Utilizou-se a sequência de *Candidatus Brocadia brasilensis* (GQ896513.1) como referência no Brasil, dado que foi obtida a partir de enriquecimento de biomassa com inóculo proveniente de sistemas de lodos ativados da ETE Arrudas de Belo Horizonte, MG (Campos, 2012).

Ocorreu a formação de 3 *clusters* separando as sequências em: a) aquelas geradas a partir de DNA de amostras de sistemas ambientais sob condições sub-óxicas; b) a pertencente à sequência de “*Candidatus Brocadia brasilensis*” e c) aquelas geradas a partir de DNA de amostras de sistemas de tratamento de efluentes e/ou de sistemas biológicos ajustados para atividade e/ou enriquecimento anammox (Figura 5.21).

Os *clusters* formados pelas sequências obtidas a partir do DNA da biomassa dos inóculos antes de serem inseridos nos sistemas apresentaram maior similaridade com a sequência referência “*Candidatus Brocadia brasilensis*” (88%) do que com as sequências obtidas a partir do DNA das biomassas dos sistemas biológicos (86%).

As sequências obtidas a partir do DNA das biomassas antes de serem inseridas nos sistemas biológicos apresentaram similaridades elevadas (maiores que 97%) com sequências relacionadas às biomassas de sistemas ambientais em condições sub-óxicas, permitindo inferir que bactérias proximamente relacionadas se estabelecem nesses tipos de ecossistemas (Figura 5.21). A salinidade é o fator determinante para o padrão de distribuição global de bactérias anammox, tendo sido registrado espécies similares quando as condições ambientais são semelhantes (Sonthiphand *et al.*, 2014).

Da mesma maneira, as sequências obtidas de fragmentos de DNA da biomassa dos sistemas biológicos, após 120 dias do início da operação ajustadas as condições para enriquecimento anammox, apresentaram similaridades elevadas (maiores que 99%) com sequências de sistemas de tratamento pelo processo anammox (Figura 5.21). Todas as sequências,

depositadas no *GenBank* e utilizadas para comparações, foram reconhecidas como biomassas com atividade anammox e, portanto, como sequência de possíveis candidatas anammox (Sánchez-Melsió *et al.*, 2009; Kalyuzhnyi *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010, Sonthiphand *et al.*, 2014). Conforme conclusão apresentada por Sonthiphand *et al.* (2014) ocorre uma partição de habitats entre as candidatas espécies anammox, separando as comunidades anammox em ecossistemas naturais daquelas em ambientes antropizados como as ETEs.

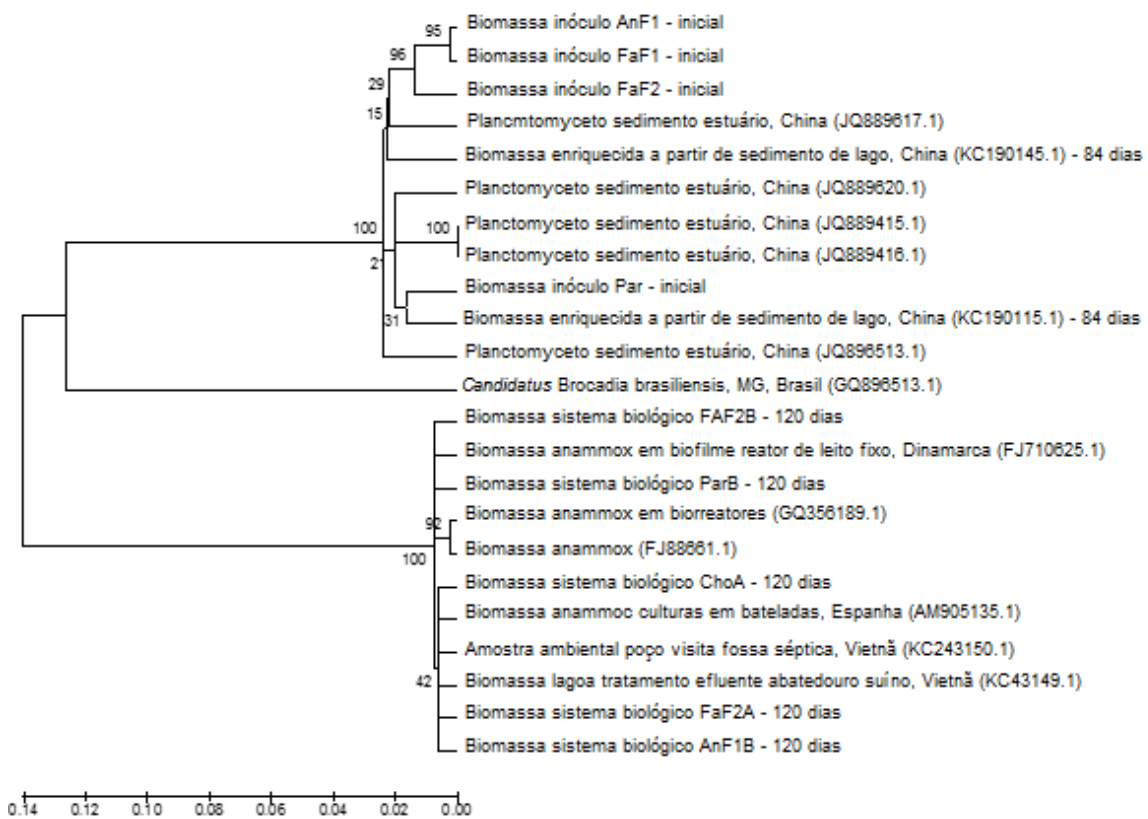


Figura 5.21: Dendrograma mostrando a afiliação filogenética das sequências obtidas a partir da biomassa dos inóculos e dos sistemas biológicos após 120 dias com sequências depositadas no *GenBank* a com similaridades elevadas dada por comparações usando *BLAST*. O dendrograma foi gerado usando fragmento de 720 pb do gene RNAr 16S relacionado ao grupo anammox. Os valores presentes nos nós da árvore indicam a porcentagem de vezes que os ramos se repetiram em 1000 análises de re-amostragens. A barra de escala representa a diferença estimada nas posições dos nucleotídeos entre as sequências.

A partir dessas comparações, é possível sugerir que as condições operacionais estabelecidas para desenvolvimento da atividade anammox provocou a mudança de dominância das bactérias anammox daquelas originalmente presentes nos inóculos (Figura 5.21), conforme a partição de habitats entre bactérias anammox proposta por Sonthiphand *et al.* (2014).

A mudança de dominância das espécies anammox quando estabelecidas as condições para enriquecimento e atividade pode ser a resposta para os elevados tempos de partidas de sistemas que visam a remoção da amônia pelo processo anammox, uma vez que a duplicação da biomassa é lenta devido às baixas taxas de crescimento desses micro-organismos.

Modificações na comunidade anammox, antes e após o período destinado ao enriquecimento, foram relatadas em outros estudos que também discutiram quais as forças seletivas dirigindo essas alterações. Park *et al.* (2010) acompanharam o estabelecimento da comunidade anammox em dois sistemas de reatores (RBS e reator com meio suporte) inoculados com biomassas diferentes e alimentados com efluente de um digestor anaeróbio de uma ETE em Nova York, EUA, tendo ao final predominado, em ambos sistemas, clones relacionados à “*Ca. Brocadia sp. 40*”. Durante o desenvolvimento experimental avaliou-se que a biomassa originária de um reator anammox, escala plena, na cidade de Strass na Áustria com clones relacionados à “*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*”, modificou-se para clones relacionados à “*Ca. Brocadia fulgida*” quando em reator anammox, escala piloto, e para clones relacionados à “*Ca. Brocadia sp. 40*” quando em reator anammox em escala de bancada (Park, *et al.* 2010).

Date *et al.* (2009) observaram a dominância de “*Ca. Brocadia anammoxidans*” em sistema de 3 reatores tubulares de fluxo contínuo e biomassa imobilizada inoculados diferentemente com biomassa a partir de uma estação de tratamento de esgoto, de um digestor anaeróbio e de um tanque de nitrificação tratando dejetos suínos e alimentando com água residuária sintética. Registrou-se também clones de “*Ca. Brocadia fulgida*” no reator inoculado com lodo de estação de tratamento de esgoto. Esses autores sugerem que o modo de operação dos reatores promove a dominância de uma das espécies originalmente presente no inóculo (Date *et al.*, 2009).

Com os resultados obtidos nesse trabalho e os da literatura, pode-se inferir que as alterações de dominância ocorridas nas comunidades anammox, ao longo do período para enriquecimento, são responsáveis pelo tempo gasto na partida de sistemas que visam a

remoção de nitrogênio pelo processo anammox. A espécie que torna dominante precisa passar por períodos sucessivos de duplicação até que atinja abundância suficiente para que prevaleça nos sistemas e resulte em eficiente remoção de amônia. Além do mais, independentemente da origem do inóculo, parece existir uma convergência da espécie anammox dominante que se estabelece nos sistemas ajustados às mesmas características operacionais. Sugere-se que o inóculo venha a contribuir para o rápido *start-up* dos sistemas quando apresenta alta dominância original da espécie que se estabelecerá nos sistemas dadas as condições operacionais.

### 5.3.2 - Etapa 2: Comportamento de conversão dos compostos nitrogenados

Na etapa 2 os sistemas biológicos, com biomassas resultantes da etapa 1, foram submetidos às bateladas com duração de 72 horas com troca volumétrica de 65% da água residuária sintética, após sedimentação da biomassa, com introduções crescentes dos substratos amônia e nitrito. Essas condições de operação foram estabelecidas para todos os sistemas biológicos, independentemente do sucesso de enriquecimento dos micro-organismos anammox na 1ª etapa.

Nessa etapa foram realizadas avaliações das concentrações dos íons nitrogenados e dos valores de pH em intervalos de 24 horas, caracterizando os perfis temporais de 0-24 horas; 24-48 horas; 0-48 horas; 48-72 horas; 0-72 horas. Os resultados obtidos para as concentrações dos íons foram transformados em relações molares para obtenção dos índices estequiométricos e comparação aos índices alcançados quando ocorre o predomínio da reação anammox nos sistemas biológicos (Equações 5.1 e 5.2).

$$\frac{[NO_2^-]}{[NH_4^+]} = 1,32 \quad \text{Equação 5.1}$$

$$\frac{[NO_3^-]}{[NH_4^+ + NO_2^-]} = 0,28 \quad \text{Equação 5.2}$$

### 5.3.2.1 - Avaliação dos sistemas biológicos em duplicatas

Como realizado para a 1ª etapa, foi verificado se os sistemas biológicos operados em duplicata apresentaram comportamentos similares de conversões das formas nitrogenadas. Devido às adaptações dos micro-organismos às condições estabelecidas nos sistemas, verificadas pelas substituições de dominância das supostas bactérias anammox, antes e após o período ajustado para ocorrência de enriquecimento, pode-se esperar que os sistemas biológicos venham a se comportar diferentemente dadas pequenas variações das condições entre os sistemas A e B.

Tendo-se os dados das concentrações dos íons amônia, nitrito e nitrato (mM) foram realizados os testes de *Kolmogorov-Smirnov* (D) e de *Shapiro-Wilk* (D) para verificar a normalidade dos dados considerando  $p < 0,05$ . O teste de *Levene* (F) foi realizado para testar a homogeneidade das amostras com  $p < 0,05$ .

Para realização dos testes foram utilizados os dados brutos de redução das concentrações de amônia e nitrito e acréscimo de nitrato em mM, obtidas pela diferença entre os tempos de coleta de amostras dentro de cada batelada. Dessa maneira, como os intervalos de tempo se configuraram como variáveis interferindo nas concentrações dos íons em análise, fez-se uma avaliação da distribuição normal e homogeneidade entre as duplicatas considerando esse fator.

Na análise utilizou-se a comparação de normalidade e homogeneidade do comportamento dos íons (amônia, nitrito, nitrato em mM) para cada intervalo de tempo dado o início de cada batelada, sendo eles (T0\_T1  $\Leftrightarrow$  0\_24 horas; T1\_T2  $\Leftrightarrow$  24\_48 horas; T0\_T2  $\Leftrightarrow$  0\_48 horas; T2\_T3  $\Leftrightarrow$  48\_72 horas; T0\_T3  $\Leftrightarrow$  0\_72 horas). Os dados utilizados foram os obtidos em 10 bateladas para cada sistema biológico componente das duplicatas (A e B). A homogeneidade foi avaliada usando a comparação da variância de um dado íon, se igual ou diferente entre os sistemas A e B, mas observando-se a variância dentro de cada intervalo de tempo foi homogênea ou heterogênea para cada sistema componente da duplicata.

Os resultados dos testes para avaliação da normalidade dos dados de concentrações dos íons nitrogenados por *Kolmogorov-Smirnov* (D) e de *Shapiro-Wilk* (D) e para avaliação da homogeneidade pelo teste *Levene* (F) demonstraram que deveriam ser aplicados testes não paramétricos para comparação da igualdade das duplicatas (Apêndice V – CD).



As modificações das concentrações dos íons são dependentes do tempo dentro de cada batelada, uma vez que implicam na velocidade de utilização dos substratos para cada grupo de micro-organismos presente, influenciando na disponibilidade futura dos íons. Além do mais, devido ao longo tempo experimental as biomassas nos sistemas biológicos adaptam-se e aumentam as concentrações dos grupos de micro-organismos que melhores se ajustam às condições estabelecidas.

As conversões das formas nitrogenadas dependem das densidades dos grupos de micro-organismos nos sistemas biológicos, das concentrações dos substratos limitantes e das concentrações de substâncias inibitórias a cada grupo de micro-organismos.

Adotou-se o teste não paramétrico dos Postos com Sinais de Wilcoxon (F) para comparação entre os sistemas em duplicatas A e B. Buscou avaliar se os mesmos continuaram a agir como duplicatas na conversão dos compostos nitrogenados. Para tanto realizou-se o levantamento das hipóteses, sendo:  $H_0 = F(\text{Sistema A}) = F(\text{Sistema B})$  e  $H_1 = F(\text{Sistema A}) \neq F(\text{Sistema B})$  (Apêndice V – CD).

No teste não existe uma previsão de qual sistema apresenta maior ou menor conversão, considera-se apenas as igualdades e desigualdades entre os valores lidos de conversão para amônia, nitrito e nitrato e, portanto, a análise bilateral. Os sistemas foram considerados variáveis dependentes e, dessa maneira, os dados para os sistemas A e B foram colocados como emparelhados.

No teste de Postos com Sinais de Wilcoxon calculou-se a diferença entre as observações de cada amostra (teste e tempo) das duas variáveis dependentes, nesse caso sistema A e sistema B. As diferenças foram transformadas em postos adicionando os sinais positivo ou negativo, de acordo com o cálculo. Ao final separou-se os postos com sinais negativos e positivos e obteve-se a soma dos postos com mesmos sinais. A estatística desse teste (T) é utilizar o menor dos dois valores obtidos na soma dos postos com sinais diferentes.

Os resultados obtidos nos testes de Postos com Sinais de Wilcoxon para todos os conjuntos de duplicatas foram analisados e resultaram na conclusão que apenas os sistemas biológicos de duplicatas com inóculos provenientes dos lodos da lagoa facultativa (FaF2) e do reator Uasb (UaF2) tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG permaneceram com comportamentos similares na conversão dos compostos nitrogenados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5.8) (Apêndice V – CD).

Tabela 5.8: Análise dos sistemas biológicos A e B para verificação da igualdade estatística entre duplicatas na conversão dos íons nitrogenados.

	IONS (mM) / Intervalo tempo	SISTEMAS BIOLÓGICOS					
		ParA ParB	AnF1A AnF1B	FaF1A FaF1B	FaF2A FaF2B	UaF2A UaF2B	ChoA e ChoB
AMONIA	T0_T1 (0 a 24 horas)	Não	✓	Não	✓	✓	✓
	T1_T2 (24 a 48 horas)	✓	Não	Não	✓	✓	Não
	T0_T2 (0 a 48 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	Não
	T2_T3 (48 a 72 horas)	✓	Não	✓	✓	✓	✓
	T0_T3 (0 a 72 horas)	✓	Não	Não	✓	✓	Não
NITRITO	T0_T1 (0 a 24 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	T1_T2 (24 a 48 horas)	Não	Não	✓	Não	✓	✓
	T0_T2 (0 a 48 horas)	✓	Não	✓	✓	✓	Não
	T2_T3 (48 a 72 horas)	Não	✓	✓	✓	✓	✓
	T0_T3 (0 a 72 horas)	✓	Não	✓	✓	✓	✓
NITRATO	T0_T1 (0 a 24 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	T1_T2 (24 a 48 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	T0_T2 (0 a 48 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	Não
	T2_T3 (48 a 72 horas)	Não	✓	✓	✓	✓	✓
	T0_T3 (0 a 72 horas)	✓	Não	Não	✓	✓	✓
<b>Desigualdades</b>		<b>4</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
<b>Igualdade estatística</b>					<b>SIM</b>	<b>SIM</b>	

Significados: Não = duplicatas diferiram no íon e tempo considerados; ✓ = duplicatas não diferiram no íon e tempo considerados; Sim = Sistemas que não foram significativamente diferentes, apresentando comportamento similares nas concentrações dos íons nitrogenados (Apêndice V – CD).

Com base nos resultados do Teste de Wilcoxon de Postos com Sinais foram apresentados todos os resultados como tendo-se 12 diferentes sistemas biológicos, mas fazendo-se uma comparação entre os sistemas que tiveram a mesma origem da biomassa inoculada. Ainda que os sistemas biológicos FaF2A - FaF2B e UaF2A - UaF2B demonstraram comportamentos em conversões dos íons nitrogenados semelhantes estatisticamente, optou-se em apresentar os resultados de cada sistema ao invés do valor médio para as duplicatas A e B.

### 5.3.2.2 - Comportamento de conversão dos íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) pela comparação à relação estequiométrica pelo processo anammox

A relação entre a redução concomitante de nitrito e amônia pela estequiometria da reação do processo anammox é de 1,32. No entanto, para análise dos dados e testes de comparações entre os sistemas realizou-se a transformação dos dados obtidos devido às grandes diferenças entre as reduções das concentrações de amônia e nitrito que resultaram distribuições de frequências dos escores com muitos valores atípicos e extremos (Field, 2009). Dessa maneira, realizou-se a transformação dos dados usando ( $\text{Log}_{10}(X_i + 2)$ ). Nessa condição, com os dados transformados, a relação estequiométrica entre nitrito e amônia pelo processo anammox é de 0,521 (Figura 5.22).

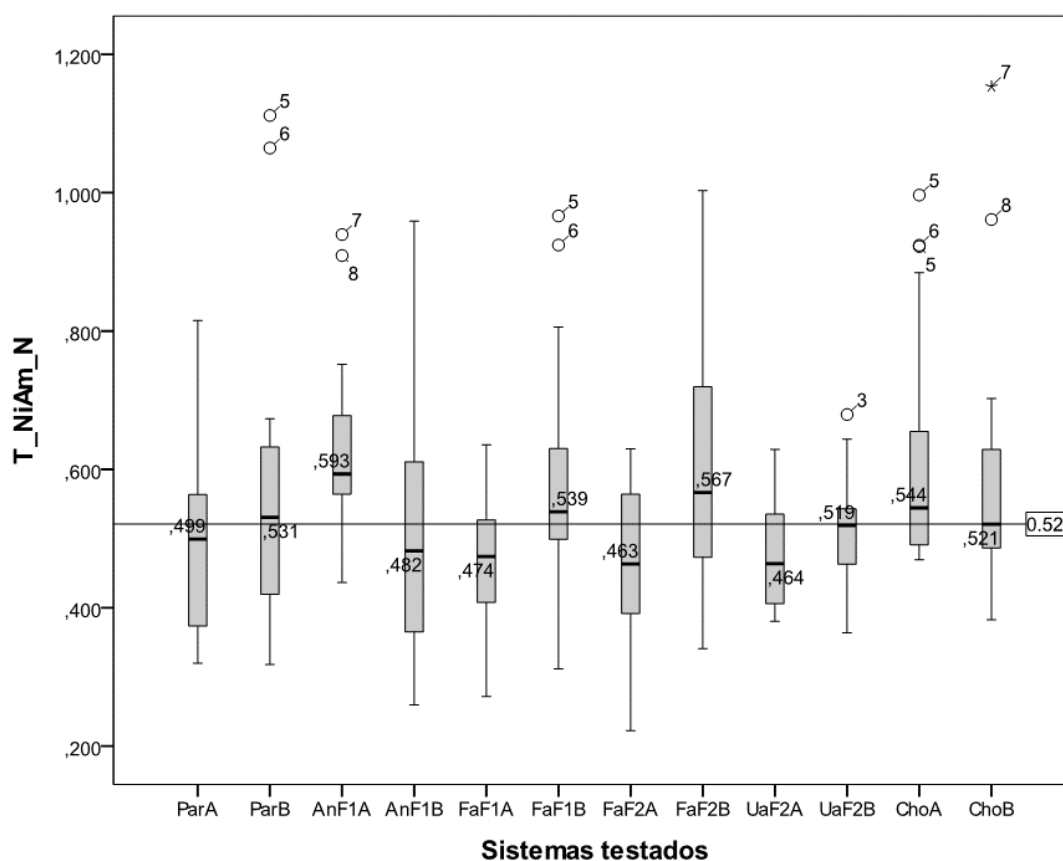


Figura 5.22: Indicadores descritivos para o comportamento de conversão concomitante dos íons nitrito e amônia comparada à relação estequiométrica dada pelo processo anammox, usando-se os dados de 10 bateladas e 5 diferentes intervalos de tempo dentro de cada batelada. Os indicadores descritivos tratam-se da mediana, 1° e 2° quartis, desvio padrão, valores atípicos e extremos. A linha traçada indica o valor obtido quando se obtém uma relação estequiométrica perfeita unicamente pelo processo anammox de 0,521. No eixo das ordenadas indica-se que  $T_{\text{NiAm}_N}$  é a relação transformada por  $((\text{Log}_{10}(X_i + 2)))$  entre nitrito e amônia em forma de nitrogênio em mM.

Verificou-se uma variação acentuada nas concentrações iônicas realizando-se a avaliação da conversão concomitante dos íons nitrito e amônia para todos os sistemas biológicos testados, indicando que até essa etapa experimental não ocorreu estabilização do processo anammox nos sistemas. Portanto, as conversões de nitrito e amônia podem ser decorrentes da combinação de vários processos metabólicos passíveis de ocorrerem nos sistemas, como a nitrificação, nitratação e desnitrificação. No entanto, ressalta-se que nessa avaliação considerou-se a combinação dos dados obtidos em todas as bateladas e em todos os intervalos de tempo dentro de cada batelada.

Destacam-se os sistemas biológicos com biomassa oriunda do reator UASB do frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2 A e B), que apresentaram uma menor variação e tiveram a maior parte dos seus dados próximos a 0,521 para a relação entre nitrito e amônia dada pelo processo anammox.

Da mesma maneira, foi avaliada a combinação dos dados obtidos pela formação de nitrato com redução concomitante de nitrito e amônia para todos os sistemas biológicos testados. Essa relação estequiométrica pelo processo anammox é de 0,28. No entanto, para análise dos dados e testes de comparações entre os sistemas, realizou-se a transformação dos dados obtidos devido às grandes diferenças entre as reduções das concentrações de amônia e nitrito, bem como da produção de nitrato que resultaram distribuições de frequências dos escores com muitos valores atípicos e extremos (Field, 2009). Dessa maneira, realizou a transformação dos dados usando  $(\text{Log}_{10}(X_i + 2))$  resultando no valor de 0,358 para essa relação (Figura 5.23).

Na relação entre a produção de nitrato com a redução concomitante de nitrito e amônia obteve-se uma variação acentuada para todos os sistemas biológicos testados, confirmando a não estabilização do processo anammox até essa etapa experimental. Para essa análise, considerou a combinação dos dados obtidos em todas as bateladas e em todos os intervalos de tempo dentro de cada batelada (Figura 5.23). Discute-se que a estabilização do processo anammox seja atingida quando a sua estequiometria é preponderante (consumo de 1 mol de  $\text{NH}_4$  e 1,32 mol de  $\text{NO}_2$  e formação de 0,26 mol de  $\text{NO}_3$ ) (Dapena-Mora *et al.*, 2004; Tsushima *et al.*, 2017; Bae *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2013).

Destacam-se novamente o comportamento dos sistemas biológicos com biomassa oriunda do reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2 A e B), que

resultaram numa relação entre formação de nitrato com redução concomitante de nitrito e amônia significativamente inferior a esperada pela reação anammox. Interpreta-se que processo de desnitrificação heterotrófica permaneceu atuante nesses sistemas (Figuras 5.23 e 5.24). No entanto, ainda que a ocorrência concomitante do metabolismo heterotrófico nos sistemas biológicos tenha sido considerada não desejável devido à competição pelo substrato, sugere-se que a sua ocorrência nos sistemas UaF2 possa ter favorecido as bactérias anammox.

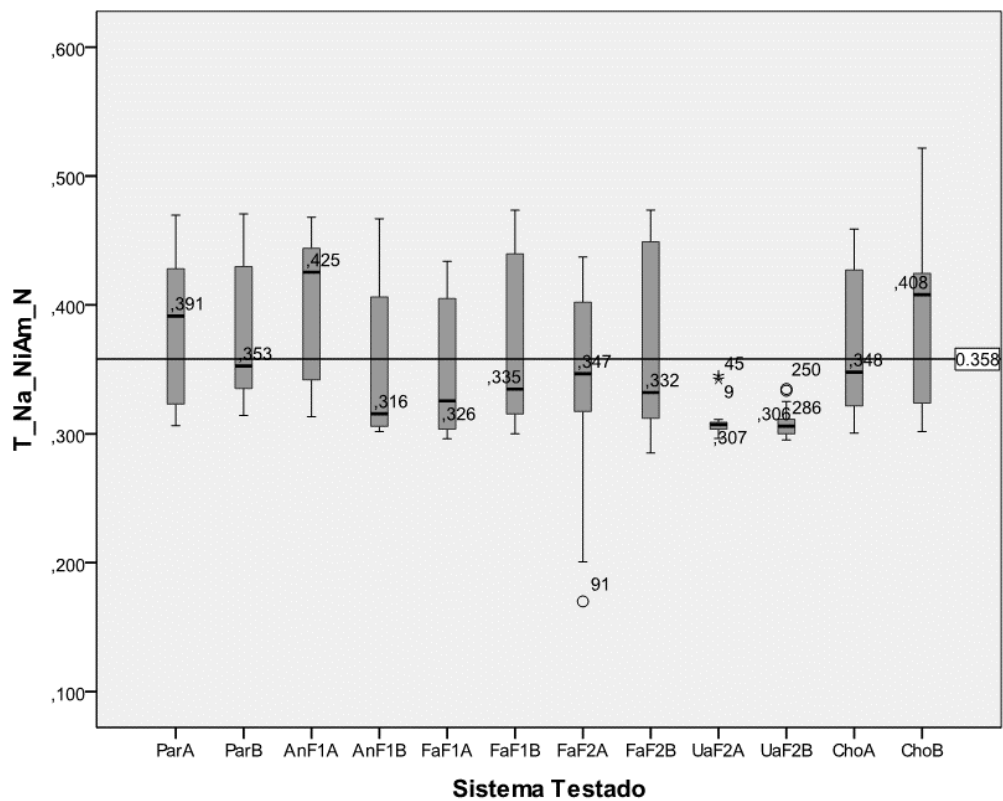


Figura 5.23: Indicadores descritivos para o comportamento de formação de nitrato a partir da redução concomitante dos íons nitrito e amônia comparada à relação estequiométrica dada pelo processo anammox, usando-se os dados de 10 bateladas e 5 diferentes intervalos de tempo dentro de cada batelada. Os indicadores descritivos tratam-se da mediana, 1º e 2º quartis, desvio padrão, valores atípicos e extremos. A linha traçada indica o valor obtido quando se obtém uma relação estequiométrica perfeita unicamente pelo processo anammox de 0,358 entre esses três íons. No eixo das ordenadas indica-se que  $T_{Na\_NiAm\_N}$  é a relação transformada por  $((\text{Log}_{10}(X_i + 2))$  entre a formação de nitrato a partir da redução concomitante de nitrito e amônia em forma de nitrogênio em mM.

De forma contrária, interpreta-se que as bactérias heterotróficas desnitrificantes foram removidas dos demais sistemas biológicos principalmente para os sistemas Par A e B; AnF1 A; FaF1 B; FaF2 B; Cho A e B, uma vez que o nitrato acumulou nos sistemas. No entanto, o nitrato acumulado nesses sistemas é superior ao formado exclusivamente pelo processo anammox, indicando que os micro-organismos nitratantes como *Nitrobacter* foram os principais responsáveis para essa maior produção (Figura 5.24). A partir da análise dos valores médios, obtidos pela relação estequiométrica dada pela formação de nitrato a partir da redução concomitante de nitrito e amônia, reforça-se a capacidade de auto-organização dos sistemas biológicos visto que os sistemas AnF1B; FaF1A e FaF2B apresentaram uma menor produção de nitrato dada pela relação anammox.

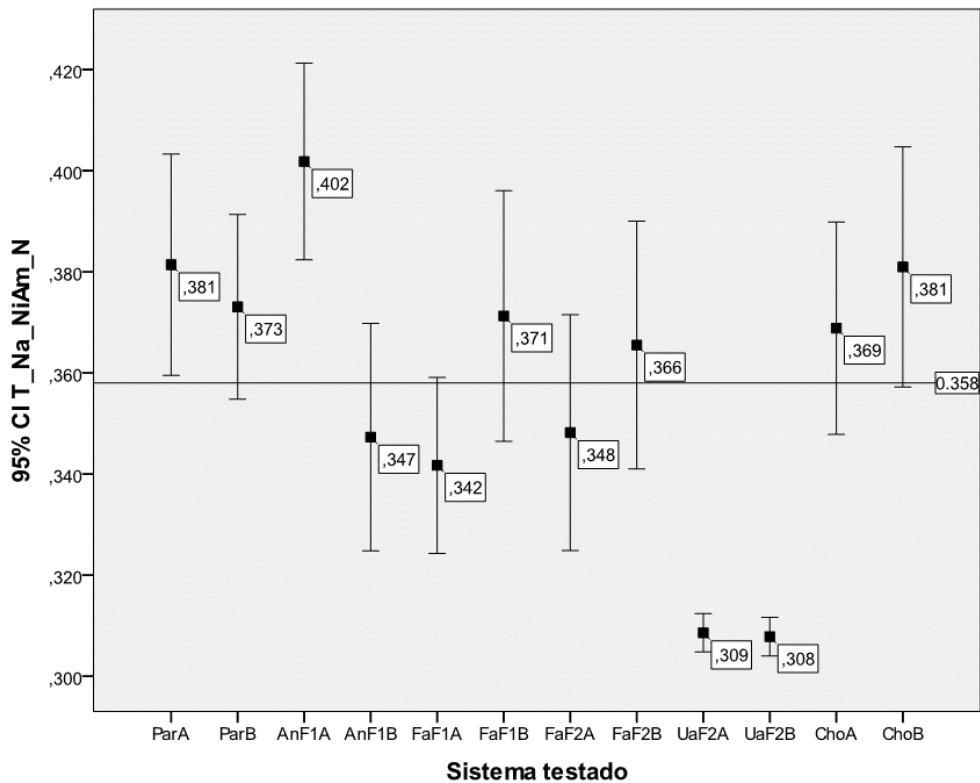


Figura 5.24: Relação estequiométrica entre a formação de nitrato a partir da redução concomitante dos íons nitrito e amônia comparada à relação estequiométrica dada pelo processo anammox, usando-se os dados de 10 bateladas e 5 diferentes intervalos de tempo dentro de cada batelada. A linha traçada indica o valor obtido quando se obtém uma relação estequiométrica perfeita unicamente pelo processo anammox de 0,358 entre esses três íons. No eixo das ordenadas indica-se a média e o desvio padrão para T\_Na\_NiAm\_N que é a relação transformada por  $((\text{Log}_{10} (X_i + 2)))$  entre a formação de nitrato a partir da redução concomitante de nitrito e amônia em forma de nitrogênio em mM com um intervalo de confiança de 95%.

As bactérias nitratantes como *Nitrobacter* permaneceram nos sistemas, ainda que as condições de anaerobiose não devessem favorecê-las, mas adaptaram-se a essas baixas concentrações de oxigênio. A oxidação química do nitrito, sem atuação biológica, é somente importante em ambientes com valores baixos de pH (Udert *et al.*, 2005). O nitrito, em  $\text{pH} < 4$ , forma o  $\text{HNO}_2$  e combinando-se com o oxigênio livre, oxida-se a nitrato conforme:  $\text{HNO}_2 + 0,5\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{NO}_3^- + \text{H}^+$  (Takenaka *et al.*, 1998). Visto que os valores pH predominantes nos sistemas foram  $> 7$ , infere-se que a formação do nitrato nos sistemas deva-se à ação biológica.

Analisou-se a dispersão dos dados obtidos com as duas relações estequiométricas usadas para avaliação do processo anammox, sendo elas Ni\_Am (Nitrito/Amônia) e Na\_NiAm (Nitrato/Nitrito + Amônia), considerando-se os diferentes intervalos de tempo e não foram encontradas correlações significativas entre os índices estequiométricos da reação anammox com o tempo dentro das bateladas para todos os sistemas biológicos analisados (Apêndice VI - CD). Entende-se que os sistemas biológicos a cada nova batelada apresentaram comportamentos diferenciados dado às adaptações e estabelecimento das espécies dominantes nas comunidades biológicas de cada sistema.

A permanência do nitrito ao longo das bateladas foi avaliada uma vez que é o principal substrato limitante ao processo anammox. O nitrito pode ser consumido também pelas bactérias nitratantes como *Nitrobacter* e pelas desnitrificantes heterotróficas e, assim pode encontrar-se esgotado de acordo com a duração das bateladas. Inicialmente, nas duas primeiras bateladas, o nitrito tornou-se limitante após 24 horas apenas para os sistemas biológicos UaF2 A e B, enquanto nos demais sistemas suas concentrações permaneceram entre 30 a 50% daquelas inicialmente inseridas, após 72 horas. Nas bateladas seguintes, os sistemas AnF1A e B; FaF1A e ChoB passaram a utilizar quase todo o nitrito até 24 horas. Nas últimas bateladas, em todos os sistemas biológicos, o nitrito permaneceu em concentrações não limitantes até as 72 horas.

As taxas de consumo horário do nitrito variaram entre os diferentes sistemas biológicos, sendo que as maiores taxas foram verificadas até 24 horas para os sistemas PaA ( $18 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ), PaB ( $25 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ), AnF1A ( $31 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ), FaF2A ( $21 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ); Cho A ( $20 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e Cho B ( $27 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ) tornando-se decrescentes nos próximos intervalos de tempo. Para o sistema FaF1B ( $27 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ), as taxas de consumo horário de nitrito foram crescentes entre os intervalos de 24 e 48 horas do início das bateladas e entre o intervalo de 48 e 72 horas para

o sistema FaF2B ( $26 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Para os sistemas UaF2 A ( $90 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ) e UaF2B ( $11 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ) as taxas foram constantes ao longo dos intervalos de tempo das bateladas.

Correspondentes às taxas de consumo de nitrito, as taxas de remoção de nitrogênio foram maiores para os sistemas biológicos Cho B ( $40,7 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ); PaB ( $38,5 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ); AnF1A ( $37,9 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ); PaA ( $36,8 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ); FaF2A ( $36,3 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ); Cho A ( $35,2 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ ) respectivamente nas 24 horas iniciais das bateladas. Essas taxas foram iguais aquelas obtidas com cerca de 140-180 dias em sistemas operados e alimentados de maneira similar a este estudo, usando inóculo a partir de um reator com discos rotativos submersos (Tsushima *et al.*, 2007). Taxas maiores de remoção de nitrogênio, em torno de  $292 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ , só foram obtidas depois de 400 dias de operação dos sistemas (Tsushima *et al.*, 2007).

As concentrações de nitrato presentes nos sistemas biológicos ao longo das bateladas foram decorrentes dos processos metabólicos anammox, nitratação e desnitrificação heterotrófica. Ao início dos experimentos na 2ª etapa todos os sistemas biológicos apresentaram produções próximas ou inferiores àquelas esperadas pelo processo anammox. No entanto, nas bateladas seguintes ocorreram produções de nitrato superiores às registradas pelo processo anammox.

Devido às concentrações de nitrato não poderem ser atribuídas unicamente ao processo anammox, realizou-se uma avaliação para justificar a produção de nitrato com seu acúmulo nos diferentes intervalos de tempo dentro das bateladas a partir, exclusivamente, da oxidação aeróbia com a consequente redução das concentrações de nitrito no licor dos sistemas biológicos (Tabela 5.9) (Apêndice VI - CD).

No primeiro conjunto de sistemas avaliados ParA e ParB, pode-se supor que as concentrações de nitrato não podem ser explicadas somente pela oxidação aeróbia do nitrito, visto que intervalos com remoções altas de nitrito resultaram em concentrações baixas de nitrato. No sistema biológico ParA apenas para o intervalo T1\_T2 (24 a 48 horas) foi que se observou uma maior relação entre as concentrações de nitrato produzido e nitrito consumido (Tabela 5.9). Nos demais intervalos de tempo dentro das bateladas ocorreram fracas correlações entre esses dois ânions. Numa avaliação total das bateladas, pode-se atribuir pelo menos 40% do nitrato formado à oxidação aeróbia do nitrito (Tabela 5.9).



Tabela 5.9: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) nos sistemas biológicos, dada pelo valor de R<sup>2</sup> calculado.

Sistema	Intervalos de tempo*					Total
	T0_T1	T1-T2	T0_T2	T2_T3	T0_T3	
<b>Par A</b>	0,187	0,666	0,392	0,335	0,178	<b>0,423</b>
<b>Par B</b>	0,593	0,327	0,485	0,510	0,157	<b>0,533</b>
<b>AnF1 A</b>	0,849	0,254	0,525	0,449	0,112	<b>0,606</b>
<b>AnF1 B</b>	0,831	0,055	0,687	0,433	0,298	<b>0,590</b>
<b>FaF1 A</b>	0,801	0,065	0,580	0,783	0,319	<b>0,566</b>
<b>FaF1 B</b>	0,078	0,411	0,287	0,401	0,305	<b>0,374</b>
<b>FaF2 A</b>	0,366	0,667	0,508	0,055	0,113	<b>0,368</b>
<b>FaF2 B</b>	0,091	0,416	0,338	0,504	0,487	<b>0,420</b>
<b>UaF2 A</b>	0,259	0,600	0,560	0,335	0,837	<b>0,145</b>
<b>UaF2 B</b>	0,063	0,134	0,002	0,241	0,044	<b>0,033</b>
<b>Cho A</b>	0,115	0,605	0,247	0,001	0,148	<b>0,181</b>
<b>Cho B</b>	0,535	0,299	0,161	0,924	0,055	<b>0,339</b>

\* T0\_T1: 0\_24 hs; T1\_T2: 24\_48 hs; T0\_T2: 0\_48 hs; T2\_T3: 48\_72 hs; T0\_T3: 0\_72 hs; Total: dados de todos os intervalos (Apêndice VI - CD).

Para o sistema biológico PaB, vários intervalos apresentaram correlações onde 50% do nitrato produzido pode ser explicado pela oxidação aeróbia do nitrito, sendo T0\_T1 (0 a 24 horas); T0\_T2 (0 a 48 horas); T2\_T3 (48 a 72 horas), assim como quando se considera o intervalo total das bateladas (Tabela 5.9).

O nitrato acumulou-se nos sistemas ParA e ParB pois as bactérias heterotróficas desnitrificantes foram, provavelmente, removidas dos sistemas devido à ausência de carbono orgânico no licor uma vez que a alimentação dos sistemas foi realizada com água residuária sintética sem fonte de carbono orgânico.

Os sistemas biológicos formados pelos pares AnF1A e AnF2B apresentaram vários intervalos de tempos dentro das bateladas nos quais as concentrações de nitrato podem ser principalmente atribuídas à oxidação aeróbia do nitrito (Tabela 5.9). Para os dois sistemas AnF1A e AnF1B, nos intervalos T0\_T1 (0 a 24 horas); T0\_T2 (0 a 48 horas) e T2\_T3 (48 a 72 horas) mais de 50% das conversões de nitrito podem ser explicadas pela oxidação aeróbia. Destaca-se que nesses sistemas biológicos nos intervalos T0\_T1 (0 a 24 horas) pode-se atribuir quase 80% da produção de nitrato à oxidação aeróbia do nitrito. Com essa atuação das bactérias aeróbias nitratantes, a maior parte do nitrito foi convertido sem consideráveis conversões das concentrações de amônia e tornando-o um substrato limitante.

Nos sistemas AnF1A e AnF1B, as correlações entre os íons nitrato e nitrito são mais fracas após as 24 horas iniciais das bateladas podendo os metabolismos anammox e de nitratação estarem ocorrendo concomitantemente. Contudo, as conversões iniciais de nitrito por bactérias nitratantes podem ter limitado as conversões por bactérias anammox.

Nesses sistemas também ocorreu o acúmulo de nitrato ao final das bateladas. A ausência de carbono orgânico no licor limitou o processo de desnitrificação heterotrófica. Ressalta-se que nas bateladas iniciais dessa 2ª etapa experimental, até o final da 2ª batelada para o sistema AnF1A e até o final da 4ª batelada para o sistema AnF1B, registraram concentrações baixas de nitrato devido ao consumo desse íon provavelmente por bactérias heterotróficas que utilizaram de concentrações residuais de carbono orgânico e/ou de lise de células de micro-organismos que não se adaptaram às condições estabelecidas nos sistemas.

Os sistemas FaF1A e FaF1B apresentaram comportamentos quanto à correlação entre os íons nitrito e nitrato diferenciados entre si (Tabela 5.9). No sistema FaF1A as concentrações de nitrato poderiam ser atribuídas principalmente à oxidação aeróbia do nitrito, durante os intervalos T0\_T1 (0 a 24 horas); T0\_T2 (0 a 48 horas) e T2\_T3 (48 a 72 horas). Considerando-se todos os intervalos de tempos dentro das bateladas, a conversão do nitrito pelas bactérias nitratantes pode ter sido o processo de oxidação predominante no sistema, explicando em até 60% o nitrato formado.

No sistema FaF1B, as produções de nitrato pela oxidação aeróbia do nitrito estiveram correlacionadas mais fracamente, podendo-se esperar que nesse sistema as bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia tenham conseguido utilizar o nitrito às taxas equivalentes às oxidadoras aeróbias. Nesse sistema as correlações maiores entre produção de nitrato pela redução das concentrações de nitrito ocorreram nos intervalos T1\_T2 (24 a 48 horas) e T2\_T3 (48 a 72 horas) (Tabela 5.9).

Até o final das 4 primeiras bateladas, o nitrato produzido nos sistemas FaF1A e FaF1B foi consumido por bactérias heterotróficas desnitrificantes devido às baixas concentrações no licor dos sistemas. As reduções nas concentrações de amônia e nitrito sejam por processos aeróbios e/ou anaeróbios resultariam em maiores concentrações de nitrato. Para esses sistemas, com biomassa da estação de tratamento de efluentes do frigorífico 1, as concentrações residuais de carbono orgânico permaneceram até cerca de 150 dias. Posteriormente, o nitrato passou acumular-se nos sistemas uma vez ocorrendo o esgotamento

do carbono orgânico nos sistemas.

Foram registradas correlações parciais e totais fracas entre a produção de nitrato pela oxidação aeróbia do nitrito no sistema FaF1B, indicando que outros processos metabólicos predominaram no sistema, em especial a oxidação anaeróbia da amônia usando o nitrito como acceptor final de elétrons (Tabela 5.9).

Nos sistemas biológicos FaF2A e FaF2B, pode-se atribuir em cerca de 50% a produção de nitrato pela oxidação aeróbia do nitrito após as 24 horas do início das bateladas. Nesses sistemas, as correlações entre produção de nitrato e consumo de nitrito foram relativamente fracas, podendo supor que outros processos metabólicos foram atuantes nos sistemas contribuindo para as conversões do nitrito e amônia presentes. Também para esses sistemas biológicos, ocorreu o acúmulo do nitrato ao final das bateladas decorrente da ausência do metabolismo de desnitrificantes heterotróficos.

Nos sistemas biológicos FaF2A e FaF2B, após conversão da maior parte do nitrito nos intervalos iniciais, ou seja, entre T0\_T1, T1\_T2, T0\_T2 que representam 48 horas das bateladas, ocorreram correlações baixas entre os íons nitrito e nitrato, indicando que o nitrito se tornou limitante no licor (Tabela 5.9).

Da mesma maneira que em outros sistemas biológicos, também para os sistemas FaF2A e FaF2B, o nitrato permaneceu acumulado nos sistemas, uma vez que o metabolismo das bactérias heterotróficas desnitrificantes não foi favorecido dado a ausência de carbono orgânico no meio.

Os sistemas biológicos com biomassa oriunda do reator UASB tratando efluente de frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2 A e UaF2 B), apresentaram correlações baixas entre aumento e redução das concentrações de nitrato e nitrito, respectivamente, provavelmente devido à ação das bactérias heterotróficas desnitrificantes que os consumiram (Tabela 5.9). Ainda que para o sistema UaF2A tenha-se obtido correlações elevadas entre as concentrações de nitrato com a redução concomitante daquelas de nitrito em alguns intervalos de tempos analisados, deve-se considerar que a redução das concentrações de nitrito pode ser atribuída também ao consumo pelas bactérias desnitrificantes (Tabela 5.9). No entanto, dado as reduções nas concentrações de amônia e baixas concentrações de nitrato indicam que sua formação seja pelo processo anammox e ou de nitratação.

Considerando-se todos os intervalos de tempos dentro de cada batelada e também todas bateladas realizadas para avaliação do comportamento da biomassa nas conversões dos íons amônia, nitrito e nitrato ocorre correlação fraca entre produção de nitrato por oxidação exclusiva por nitrito ( $R^2 = 0,145$ ) (Tabela 5.9).

No sistema biológico UaF2B, as concentrações de nitrato correlacionaram fracamente com as oxidações concomitantes do nitrito (Tabela 5.9). Da mesma maneira, a participação contínua das bactérias heterotróficas desnitrificantes foram responsáveis pelas baixas concentrações de nitrato, assim como, podem ter sido responsáveis pela remoção do nitrito dos sistemas biológicos. Considerando-se as reduções nas concentrações de amônia devida unicamente ao processo anammox faltaria nitrito que permitissem tais reduções, devendo considerar que o processo de nitrificação tenha ocorrido concomitantemente. Realizando-se os cálculos para atribuir as conversões de amônia ao processo anammox, esperar-se-ia maiores concentrações de nitrato do que as registradas. No entanto, reforça-se a ação das bactérias desnitrificantes reduzindo nitrito, nitrato e sulfato para conversão do carbono orgânico.

Os sistemas biológicos com biomassa a partir dos sedimentos da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília, DF (ChoA e ChoB) acumularam significativas concentrações de nitrato ao final das bateladas. Correlacionando-se as concentrações de nitrato pela oxidação aeróbia do nitrito não foi possível atribuir a produção do nitrato unicamente ao processo de nitrificação (Tabela 5.9). No sistema biológico ChoA a maior produção de nitrato ocorreu após 24 horas do início das bateladas, sendo que entre o intervalo T1\_T2 pelo menos 60% do nitrato pode ter sido meio da conversão direta do nitrito presente (Tabela 5.9). A ausência de fontes de carbono orgânico nos sistemas limitou o processo de desnitrificação heterotrófica dado as concentrações altas de nitrato ao final das bateladas. Apenas nas duas primeiras bateladas foi que se obteve baixas concentrações de nitrato ao fim das 72 horas do ciclo. Nesse sistema, verifica-se que as concentrações convertidas de amônia e nitrito e produzidas de nitrato deveu-se à concomitância dos processos anammox, nitrificação e nitratação.

No sistema ChoB os comportamentos de conversões de amônia e nitrito com consequente produção de nitrato não foram diferentes do sistema biológico ChoA, mudando-se apenas com relação à maior produção de nitrato ocorrer após 48 horas do início das bateladas, entre o intervalo T2\_T3 pelo menos 90% do nitrato produzido pode ser a partir da conversão direta do nitrito presente (Tabela 5.9). Contudo, considerando-se que nesse intervalo a maior parte

do nitrito já havia sido convertido, a prevalência do processo de nitratação não contribuiu para aumento significativo das concentrações de nitrato. As concentrações altas de nitrato, ao final das bateladas, também podem ser associadas a ausência de fontes de carbono orgânico para favorecer o processo de desnitrificação heterotrófica. Nas duas primeiras bateladas registrou-se baixas concentrações de nitrato ao fim das 72 horas do ciclo. Nesse sistema, considerando-se as concentrações convertidas de amônia e nitrito e produzidas de nitrato, os processos anammox, nitrificação e nitratação ocorreram concomitantemente.

Numa análise geral do comportamento dos sistemas biológicos constatou-se que a atividade anammox ficou reduzida devido à competição por substratos com os diferentes grupos de micro-organismos sendo os nitrificantes, os nitrificantes e os heterotróficos desnitrificantes. Provavelmente, o nitrito foi a substância mais limitante. O acúmulo de nitrato em vários dos sistemas biológicos deveu-se à falta de matéria orgânica para o acoplamento da desnitrificação heterotrófica que seria condutora da redução do nitrato a nitrito que permitiria a reversão do nitrato ao substrato necessário à reação anammox (Jetten *et al.*, 2005; Kalyuzhnyi *et al.*, 2006).

Quando o carbono orgânico dissolvido está presente e não pode ser aproveitado pelos micro-organismos anammox, as bactérias heterotróficas desnitrificantes podem vencer as anammox e, rapidamente, consumir o nitrito presente (Jenni *et al.*, 2014). De acordo com Tao *et al.* (2013), as bactérias anammox apresentam desvantagens competitivas com as bactérias heterotróficas, pois a reação anammox é termodinamicamente menos viável do que a reação de desnitrificação heterotrófica. Também, a síntese celular das bactérias heterotróficas é quase cinco (5) vezes maior do que das anammox sob as condições de anaerobiose (Shen *et al.*, 2011).

Além do mais, períodos elevados de retenção de biomassa, como os que foram adotados nesse estudo, para a conservação dos micro-organismos anammox podem, também, favorecer a manutenção das bactérias aeróbias oxidadoras de nitrito e, portanto, de grupos competidores pelo substrato nitrito (Jenni *et al.*, 2014).

A estratégia de operação dos sistemas biológicos para atividade anammox é um aspecto importante para a composição microbiológica da comunidade (Park *et al.*, 2010). Diferenças na composição inicial da comunidade dos inóculos podem resultar em performances diferenciadas dos sistemas biológicos após longos períodos de testes.

### 5.3.2.3 - Teste de Kruskal-Wallis comparando as relações estequiométricas anammox obtidas nos sistemas biológicos

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis permitiu comparar os sistemas biológicos frente às diferenças nas conversões das formas nitrogenadas amônia, nitrito e nitrato utilizando-se as relações estequiométricas esperadas para o processo anammox nos diferentes intervalos de tempo ao longo da duração das bateladas. Ressalta-se que o teste de Kruskal-Wallis apenas apontou a existência de diferenças nas conversões entre os sistemas biológicos testados. As relações estequiométricas utilizadas foram aquelas transformadas para consumo concomitante de nitrito e amônia ( $T_{Ni}/Am$ ) e para produção de nitrato pela conversão conjunta de nitrito e amônia ( $T_{Na}/Ni+Am$ ). Os índices estequiométricos pelo processo anammox, dada as relações transformadas, entre  $T_{Ni}/Am$  igual a 0,521 e  $T_{Na}/Ni+Am$  igual a 0,358. Considerou-se para realização dos testes comparativos os intervalos T0\_T1 (entre 0 e 24 horas); T0\_T2 (0 e 48 horas) e T0\_T3 (0 e 72 horas) (Apêndice VII – CD).

Assim, com base na relação estequiométrica entre nitrito e amônia verificou-se que os sistemas biológicos variaram significativamente nas conversões desses dois íons para o intervalo entre T0\_T2 ( $H(11) = 22,99$  e  $p < 0,05$ ). Quando comparados os sistemas para os intervalos entre T0\_T1 e T0\_T3 não se pode atribuir diferenças significativas no comportamento das biomassas entre os sistemas ( $p > 0,05$ ). Como já observado entre outras análises das conversões, o período entre 24 e 48 horas é determinante para o sucesso de um dado comportamento metabólico prevalecer nos sistemas, devido principalmente à limitação de substratos.

Mesmo tendo usado o resultado da relação entre o consumo concomitante de nitrito e amônia como parâmetro de comparações entre os sistemas inoculados com diferentes fontes de biomassa, não se obtém pelo teste de Kruskal-Wallis qual sistema apresentou melhor performance pela reação anammox. No entanto, a análise de diagramas auxilia na identificação das diferenças entre os sistemas e, ao mesmo tempo, a leitura do comportamento metabólico dado pela relação entre nitrito e amônia aproximando-a do índice estequiométrico ideal anammox (Figura 5.25).

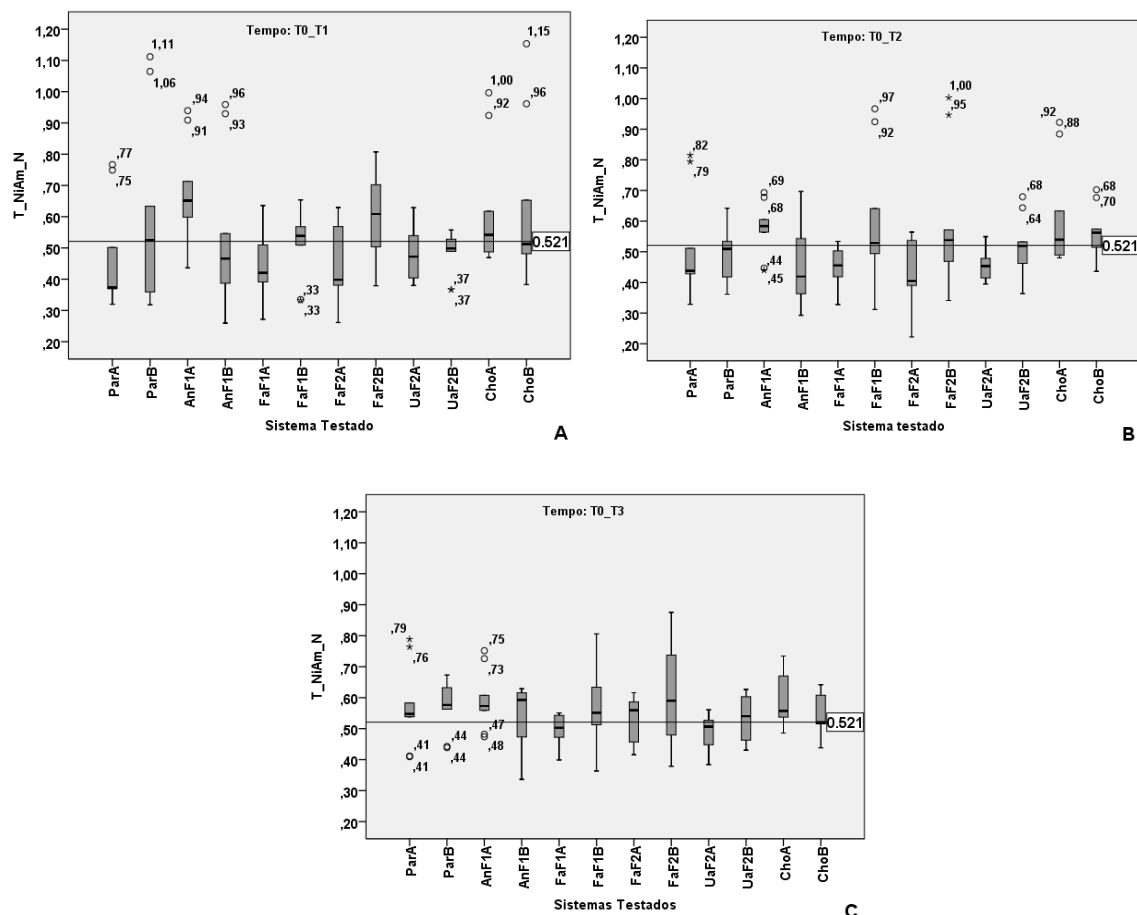


Figura 5.25: Relações estequiométricas entre as reduções concomitantes de nitrito e amônia nos intervalos de tempo A) T0\_T1 (0 a 24 horas), B) T0\_T2 (0 a 48 horas) e C) T0\_T3 (0 a 72 horas) durante as 10 bateladas conduzidas na etapa 2 visando a atividade anammox. Os resultados encontram-se apresentados por indicadores descritivos que tratam-se da mediana, 1º e 2º quartis, desvio padrão, valores atípicos e extremos. A linha traçada indica o valor obtido quando se obtém uma relação estequiométrica perfeita unicamente pelo processo anammox de 0,521. No eixo das ordenadas indica-se que T\_NiAm\_N é a relação transformada por  $((\text{Log}_{10}(X_i + 2)))$  entre nitrito e amônia em forma de nitrogênio em mM.

Os sistemas biológicos apresentaram comportamentos variantes nas conversões do nitrito e amônia. Como não se obteve variações aceitáveis, próximas ao índice estequiométrico anammox (0,521) desejado, considera-se que aqueles sistemas com a maior parte das relações inferiores ao índice apresentaram melhor performance anammox. Quando se obtém relações maiores que o índice anammox significam que maiores concentrações de nitrito foram convertidas sem que conversões correspondentes de amônia tenham ocorrido, tendo sobressaído o metabolismo das bactérias nitratantes. Considerando-se as conversões de nitrito e amônia avaliadas por meio das relações estequiométricas, verifica-se que entre os

intervalos T0\_T2, os sistemas AnF1A, FaF1B, ChoA e ChoB já resultavam em conversões maiores de nitrito do que amônia (Figura 5.25B). Ao final das bateladas de 72 horas, apenas nos sistemas FaF1A, UaF2A e UaF2B que se registraram relações entre nitrito e amônia inferiores à estipulada para o metabolismo anammox (Figura 5.25 C).

Da mesma forma, com base na relação estequiométrica entre produção de nitrato com redução concomitante das concentrações de nitrito e amônia verificou-se que os sistemas biológicos variaram significativamente quanto às concentrações desses três íons para os todos os intervalos de tempos considerados, sendo os resultados calculados pelo teste de Kruskal-Wallis iguais a T0\_T1 ( $H(11) = 29,58$  e  $p < 0,01$ ); T0\_T2 ( $H(11) = 42,93$  e  $p < 0,01$ ) e T0\_T3 ( $H(11) = 36,66$  e  $p < 0,01$ ). Esses resultados indicam que a produção de nitrato ocorre nos diferentes intervalos de tempo e que diferentes processos metabólicos influenciaram nas suas concentrações dissolvidas no licor dos sistemas biológicos ao longo das bateladas. Deve-se considerar também que a biomassa em cada sistema reage diferentemente à cada nova batelada, dependendo das espécies da comunidade microbiológica predominantes nos sistemas.

Como discutido anteriormente, não se obtém os sistemas com melhor performance anammox realizando comparações pelo teste de Kruskal-Wallis usando os resultados das relações entre a produção de nitrato com o consumo concomitante de nitrito e amônia como parâmetro comparativo. No entanto, a análise de diagramas auxilia na identificação das diferenças entre os sistemas e, ao mesmo tempo, a leitura do comportamento metabólico dado pela relação entre produção de nitrato com consumo de nitrito e amônia aproximando-a do índice estequiométrico ideal anammox (0,358) (Figura 5.26).

Considerando-se o intervalo T0\_T1 (0 a 24 horas), as quantidades de nitrato formado a partir de conversões diretas pela oxidação aeróbia do nitrito ou indiretas pela oxidação anaeróbia da amônia usando o nitrito como acceptor final de elétrons foram baixas nos sistemas biológicos ParB, AnF1B, FaF1A, FaF2A e FaF2B, UaF2A e UaF2B, indicando a permanência do substrato nitrito no licor dos sistemas (Figura 5.26 A).



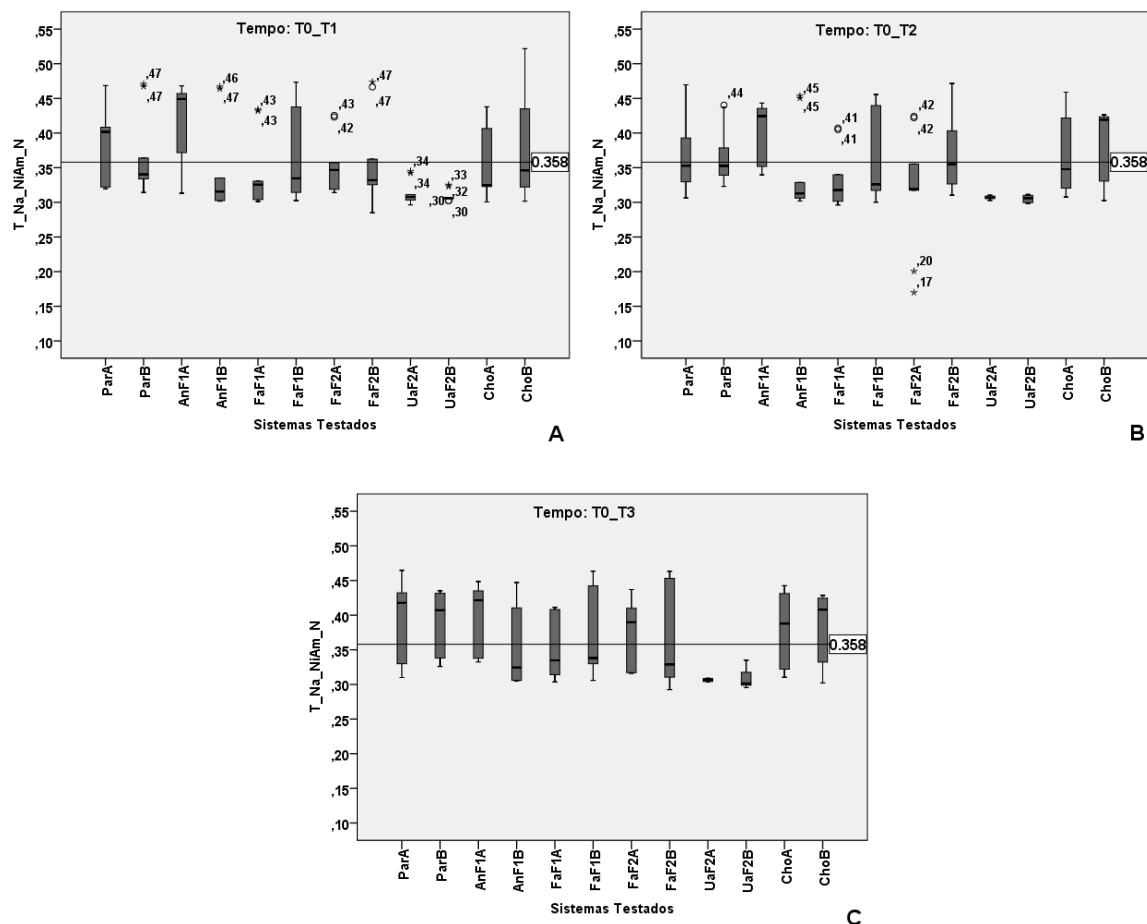


Figura 5.26: Relações estequiométricas entre a produção de nitrato com reduções concomitantes de nitrito e amônia nos intervalos de tempo A) T0\_T1 (0 a 24 horas), B) T0\_T2 (0 a 48 horas) e C) T0\_T3 (0 a 72 horas) durante as 10 bateladas conduzidas na etapa 2 visando a atividade anammox. Os resultados encontram-se apresentados por indicadores descritivos que tratam-se da mediana, 1º e 2º quartis, desvio padrão, valores atípicos e extremos. A linha traçada indica o valor obtido quando se obtém uma relação estequiométrica perfeita unicamente pelo processo anammox de 0,358. No eixo das ordenadas indica-se que  $T_{Na\_NiAm\_N}$  é a relação transformada por  $((\text{Log}_{10}(X_i + 2)))$  entre nitrato, nitrito e amônia em forma de nitrogênio em mM.

Avaliando-se as relações estequiométricas entre a produção de nitrato com reduções concomitantes das concentrações de nitrito e amônia no intervalo de tempo T0\_T2 (0 a 48 horas) das bateladas realizadas, apenas nos sistemas AnF1B, FaF1A, FaF2A, UaF2A e UaF2B que se registraram baixas concentrações de nitrato resultando em relações estequiométricas inferiores à esperada pelo processo anammox (Figura 5.26 B). No entanto, quanto maiores os valores encontrados para a relação entre as concentrações de nitrato com redução de nitrito e amônia, pressupõe-se que o metabolismo de nitratação tenha sido predominante. Também, baixas concentrações de nitrato no licor podem indicar a atividade

do metabolismo por desnitrificação heterotrófica.

Considerando todo o intervalo das bateladas, ou seja, T0\_T3 (0 a 72 horas), apenas os sistemas biológicos que foram utilizados biomassa oriunda do lodo do reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia (UaF2A e UaF2B) foram que registraram relações entre produção de nitrato com as concomitantes reduções das concentrações de nitrito e amônia inferiores à esperada pela estequiometria anammox (Figura 5.26 C). Nesses sistemas, interpreta-se que as bactérias desnitrificantes heterotróficas possam ter atuado como competidoras por nitrito com as bactérias anammox. No entanto, dadas as concentrações residuais de nitrato não se pode desprezar que a associação na comunidade microbológica entre bactérias anammox e desnitrificantes heterotróficas possam ser preferíveis à associação entre bactérias anammox e nitratantes.

#### 5.3.2.4 - Variações do pH do licor misto na etapa 2

O aumento no valor do pH do licor de sistemas biológicos, acima dos valores ajustados no início das bateladas, tem sido atribuído à ocorrência do metabolismo anammox em sistemas biológicos. A contínua variação positiva do pH ao longo das bateladas pode indicar que o processo anammox consegue compensar o consumo da alcalinidade devido ao processo de nitrificação, seja por nitrificação e/ou nitratação (Li *et al.*, 2012).

Em todos os sistemas biológicos testados, ao longo da 2ª etapa, ocorreram variações positivas do valor do pH indicando que o processo anammox, conduzido por microorganismos capazes de oxidar a amônia usando o nitrito como acceptor de elétrons, foi o responsável pelas variações do pH por produzir alcalinidade (Figuras 5.27 e 5.28).

A variação do pH foi positiva para todos os sistemas biológicos até as primeiras 24 horas do início das bateladas (Figura 5.27). Em todos os sistemas biológicos, à exceção de UaF2A e UaF2B, continuou-se a elevação dos valores do pH após as primeiras 24 horas, provavelmente devido à produção de alcalinidade, porém de forma menos acentuada. A partir das 24 horas ocorre limitação do substrato nitrito devido tanto ao consumo por bactérias anammox quanto pelas nitratantes fazendo com que as alterações do pH sejam menos acentuadas (Figura 5.27). Nos sistemas UaF2A e UaF2B, após as primeiras 24 horas,

devido às reduções dos valores do pH pressupõe-se que outros processos metabólicos, que não o anammox, predominaram nos sistemas. Provavelmente, nos sistemas UaF2A e UaF2B, a competição por nitrito por organismos nitratantes, desnitrificantes heterotróficos e anammox comprometeram a estabilidade dos sistemas (Figura 5.27). A possível redução do sulfato nesses sistemas também poderia responder pela formação de ácidos como o H<sub>2</sub>S (ácido sulfídrico) quando em solução, reduzindo os valores do pH no licor.

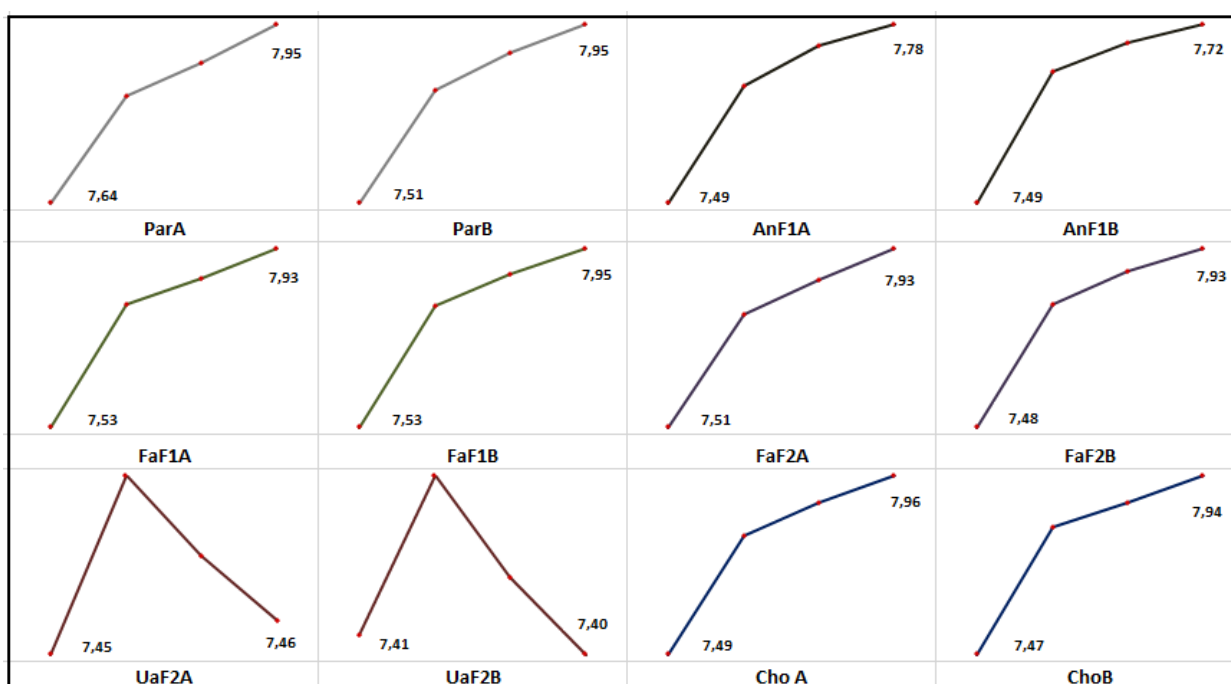


Figura 5.27: Variação do pH (em valores médios, n = 10) nos sistemas biológicos ao longo das bateladas de 72 horas durante a 2ª etapa experimental. Sendo: Par A e ParB – biomassa do sedimento do lago Paranoá de Brasília, DF; AnF1A e AnF1B – biomassa lagoa anaeróbia tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG; FaF1A e FaF1B - biomassa lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG; FaF2A e FaF2B - biomassa lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG; UaF2A e UaF2B - biomassa reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG; ChoA e ChoB – biomassa lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado JC de Brasília, DF. Cada marcador nas linhas indica: 0, 24, 48 e 72 horas consecutivamente.

O pH foi ajustado ao início de cada batelada para valores dentro da faixa de pH determinada para ocorrência do processo anammox, tendo iniciado pouco abaixo do valor considerado ótimo, visto que, esperava-se a elevação do pH do licor dos sistemas biológicos ao longo da duração das bateladas (Figura 5.28). Ao final das bateladas, os valores do pH permaneceram dentro da faixa ótima de pH para a ocorrência do processo anammox, à exceção dos sistemas com inóculos provenientes do reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia,

MG (UaF2A e UaF2B) (Figura 5.28).

Atribui-se a variação positiva do pH no licor dos sistemas biológicos ao processo anammox, uma vez que o outro processo que também resultaria em elevação do pH seria a desnitrificação heterotrófica. No entanto, pressupõe-se que esse processo metabólico foi pouco ocorrente nos sistemas visto que a ausência de fonte de carbono orgânico fez com que ocorresse o acúmulo de nitrato ao final das bateladas. Exceção aos sistemas biológicos com biomassa proveniente do reator UASB tratando efluentes do Frigorífico 2, Uberlândia (UaF2A e UaF2B), cuja presença de matéria orgânica poderia ser devida à lise de células de micro-organismos que não se mantiveram nos sistemas.

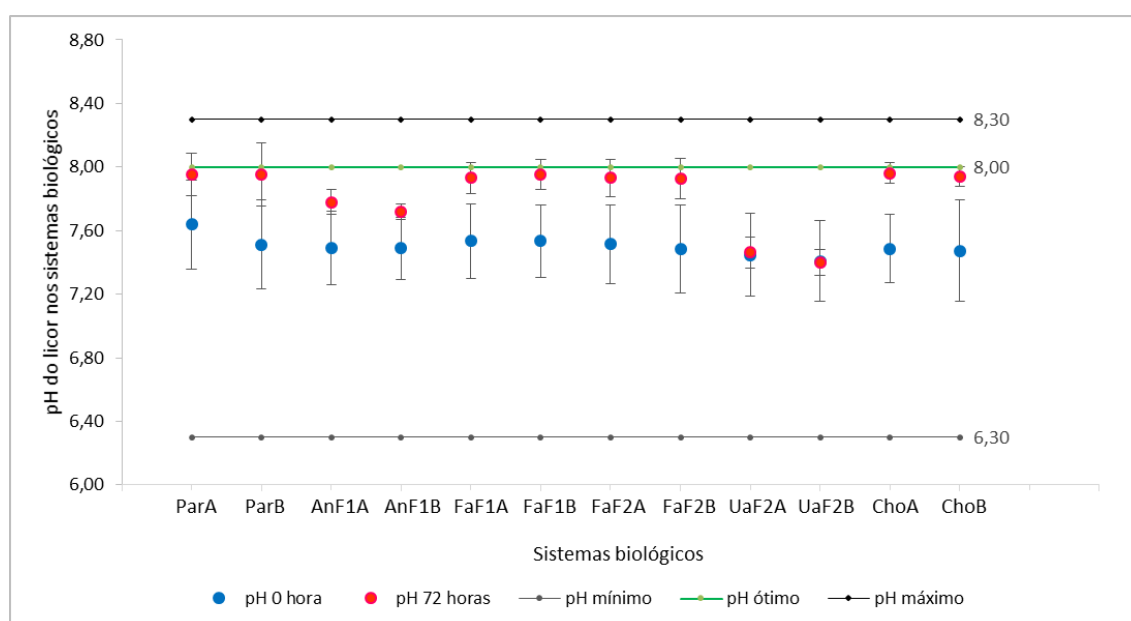


Figura 5.28: Valores médios do pH inicial (0 hora) e final (72 horas) do licor dos sistemas biológicos ao longo das bateladas de 72 horas durante a 2ª etapa experimental. Sendo: Par A e ParB – biomassa do sedimento do lago Paranoá de Brasília, DF; AnF1A e AnF1B – biomassa lagoa anaeróbia tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG; FaF1A e FaF1B - biomassa lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG; FaF2A e FaF2B - biomassa lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG; UaF2A e UaF2B - biomassa reator UASB tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG; ChoA e ChoB – biomassa lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado JC de Brasília, DF.

### 5.3.2.5 - Análises da biomassa nos sistemas biológicos após 180 dias (final da 2ª etapa)

Após 180 dias de operação dos sistemas biológicos e os mesmos terem sido submetidos às condições de operação estabelecidos nas etapas 1 e 2, foi feita a verificação dos micro-organismos pela detecção de fragmentos amplificados por PCR convencional e pela quantificação do número de cópias dos genes que codificam o RNAr 16S por PCR quantitativa utilizando *primers* específicos ao grupo de micro-organismos anammox. Da mesma forma, avaliou-se a participação dos grupos de micro-organismos nitrificantes aeróbios por análise de PCR convencional e quantitativa para entendimento dos processos metabólicos predominantes nos sistemas biológicos testados.

Após extração do DNA das biomassas, a realização de eletroforese, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) usando-se o marcador molecular *High Mass Ladder* (Invitrogen, USA) permitiu uma estimativa da concentração total do DNA genômico para cada sistema biológico da biomassa presente em 1 mL do licor misto, tendo-se um volume final de 100  $\mu\text{L}$  às diferentes concentrações entre  $2,5 \eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  a  $6,5 \eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  para cada sistema (Apêndice VIII - CD).

Após o período destinado à avaliação dos comportamentos de conversões das formas nitrogenadas pelas biomassas presentes nos sistemas biológicos, ajustados para a atividade anammox em culturas em bateladas, por meio de PCR convencional, usando *primers* e condições de amplificação anteriormente testadas na biomassa dos inóculos e dos sistemas após 120 dias, foi possível registrar amplificações positivas para fragmentos de aproximadamente 774 pb para todos os sistemas, à exceção dos sistemas AnF1B e UaF2A (Tabela 5.11) (Apêndice VIII).

Verificou-se amplificação positiva para fragmentos de DNAr relacionados ao RNAr 16S dos organismos anammox no sistema UaF2B. Nesse sistema não havia verificado amplificação de fragmentos após os 120 dias da etapa 1. No sistema UaF2A não houve amplificação como ocorrido nas análises de PCR aos 120 dias ajustados para ocorrência de enriquecimento. Comparando-se os resultados de conversão dos compostos nitrogenados amônia e nitrito e formação de nitrato entre esses dois sistemas biológicos, constata-se uma melhor performance anammox do sistema UaF2B dado as concentrações de nitrato presente ao longo das bateladas, que podem ter sido devido à oxidação anaeróbia da amônia usando o nitrito como acceptor final de elétrons.

A princípio, a ausência de ampliações positivas para os sistemas AnF1B e UaF2A não excluiu a presença de bactérias anammox nos sistemas, visto que as conversões dos compostos nitrogenados ocorridas nesses sistemas permitem inferir a participação do metabolismo anammox.

As ampliações de fragmentos do gene RNAr 16S para os micro-organismos anammox sugerem a ocorrência do metabolismo anammox nos sistemas biológicos, ainda que se possa atribuir remoções de amônia e nitrito com conseqüente produção de nitrato aos processos de nitrificação e nitratação.

Portanto, tendo-se destacado a participação dos micro-organismos nitrificantes e nitrificantes no metabolismo dos sistemas biológicos, realizou-se a análise de PCR convencional avaliando as ampliações de genes específicos *amoA* para as bactérias nitrificantes e genes relacionado aos RNAr 16S para as bactérias nitrificantes (Tabela 5.10).

Tabela 5.10: Resultados das ampliações para fragmentos de DNA por PCR para bactérias anammox, nitrificantes como *Nitrosomonas* e nitrificantes como *Nitrobacter*.

Sistema	Resultados das ampliações*		
	Anammox <sup>1</sup>	<i>Nitrosomonas</i> <sup>2</sup>	<i>Nitrobacter</i> <sup>3</sup>
<b>Par A</b>	+	-	+
<b>Par B</b>	+	-	+
<b>AnF1 A</b>	+	-	+
<b>AnF1 B</b>	-	-	+
<b>FaF1 A</b>	+	-	+
<b>FaF1 B</b>	+	-	+
<b>FaF2 A</b>	+	-	+
<b>FaF2 B</b>	+	-	+
<b>UaF2 A</b>	-	-	+
<b>UaF2 B</b>	+	-	+
<b>Cho A</b>	+	+	+
<b>Cho B</b>	+	+	+

<sup>1</sup> Anammox: usando os *primers* Pla 46F e Amx 820R para amplificação de fragmentos do gene para o RNAr 16S. <sup>2</sup> *Nitrosomonas*: usando os *primers* AmoA direto e reverso para amplificação de fragmentos do gene funcional da enzima amônia mono-oxigenase. <sup>3</sup> *Nitrobacter*: usando os *primers* Nitro 1198F e Nitro 1423R para amplificação de fragmentos do gene para o RNAr 16S (Apêndice VIII).

Na análise dos géis de agarose com os resultados das ampliações para o gene *amoA* das biomassas a partir dos sistemas biológicos verificou-se fragmentos formados de

aproximadamente 650 pb apenas para os DNAs extraídos das biomassas dos sistemas ChoA e B.

O segundo grupo analisado foram as bactérias oxidadoras aeróbias de nitrito, representadas por bactérias como *Nitrobacter*, por meio da utilização dos *primers Nitro* 1198 direto e *Nitro* 1423 reverso (Graham *et al.*, 2007), formando fragmentos de aproximadamente 225 pb (Tabela 5.10).

Com relação ao grupo de bactérias oxidadoras aeróbias do nitrito como *Nitrobacter*, supõe que estavam presentes em todos os sistemas biológicos testados, ainda que as condições estabelecidas não devessem favorecer esse grupo, elas mantiveram-se ao longo dos períodos para enriquecimento e atividade anammox e, provavelmente, atuaram como competidoras pelo substrato nitrito com as bactérias anammox (Tabela 5.10) (Apendice VIII).

A avaliação dos resultados da PCR quantitativa (PCRq) permitiu, por meio da abundância de cópias de DNA inferidas pelo ciclo de quantificação (Cq), indicar a representatividade relativa dos grupos de micro-organismos anammox, nitrificantes aeróbios de amônia (como *Nitrosomonas*) e nitrificantes aeróbios de nitrito (como *Nitrobacter*) no total do DNA genômico extraído da biomassa de cada um dos sistemas biológicos. Infere-se que quanto menor o Cq resultante pela análise de PCRq, maior o número de cópias do gene alvo.

Os resultados obtidos pela avaliação da biomassa dos sistemas biológicos após o período de 180 dias destinados ao enriquecimento e atividade de micro-organismos anammox demonstraram que do total de DNA genômico os organismos nitratantes são aqueles com maior abundância em todos os sistemas, tendo sido registrados os menores valores de Cq para as amplificações dos genes RNAr 16S específicos às bactérias como *Nitrobacter*. Sequencialmente, obteve-se menores valores de Cq para as amplificações devidas aos genes RNAr 16S específicos à micro-organismos anammox do que aquelas devidas à amplificação dos genes amoA para as bactérias como *Nitrosomonas* (Tabela 5.11).

A implicação direta da representatividade dos grupos de micro-organismos na biomassa dos sistemas biológicos, entendida pelas concentrações de fragmentos de DNA amplificados, foi o resultado dos comportamentos metabólicos ao longo das bateladas. Dessa forma, explica-se a maior produção de nitrato ocorrentes no licor dos sistemas possa ser atribuída à maior abundância dos micro-organismos nitratantes comparadas à abundância dos micro-organismos anammox. A presença de organismos como anammox e nitritantes como

*Nitrosomonas* explicam as reduções das concentrações de amônia dos sistemas.

Comparando-se a representatividade de cada grupo de micro-organismo ao final da etapa 2 (180 dias) com aqueles obtidos após a etapa 1 (120 dias), tem-se aumento na densidade de cópias de DNA de bactérias anammox dado pela redução do valor de Cq apenas para os sistemas ParA e ChoB (Tabela 5.11). Registra-se também um aumento das densidades de cópias dos organismos nitratantes para os sistemas ParA, ParB, AnF1A e de forma menos significativa para os sistemas UaF2A e UaF2B e ChoA. Nos sistemas ParB, AnF1A e AnF1B, FaF2A e FaF2B ocorreu reduções dos valores de Cq para organismos como *Nitrosomonas*, indicando um aumento da representatividade desse grupo após 180 dias quando comparados aos 120 dias (Tabela 5.11).

Tabela 5.11: Ciclos de quantificação obtidos por PCR quantitativa para os sistemas biológicos aos 120 dias relativos às condições de operação da etapa 1 e aos 180 dias relativos às condições de operação da etapa 2, destinadas ao enriquecimento e atividade dos organismos anammox.

Sistemas Biológicos	Ciclo de quantificação							
	Anammox		<i>Nitrosomonas</i> <sup>3</sup>		<i>Nitrobacter</i> <sup>4</sup>		Bacteria	
	120 <sup>1</sup>	180 <sup>2</sup>	120 <sup>1</sup>	180 <sup>2</sup>	120 <sup>1</sup>	180 <sup>2</sup>	120 <sup>1</sup>	180 <sup>2</sup>
<b>Par</b>	32,0	A = 29,83	31,3	A = 34,43	28,2	A = 23,27	18,4	A = 17,42
		B = 34,01		B = 30,10		B = 25,16		B = 18,04
<b>AnF1</b>	31,0	A = 32,19	35,0	A = 32,85	<b>23,2</b>	A = 22,18	18,5	A = 17,52
		B = 33,05		B = 33,22		B = 25,31		B = 18,20
<b>FaF1</b>	30,7	A = 35,65	33,9	A = 34,07	<b>22,2</b>	A = 23,33	<b>16,8</b>	A = 19,42
		B = 35,49		B = 33,77		B = 25,25		B = 18,85
<b>FaF2</b>	31,6	A = 33,09	35,1	A = 34,41	22,2	A = 22,37	18,8	A = 18,67
		B = 33,13		B = 33,92		B = 21,73		B = 18,89
<b>UaF2</b>	34,1	A = 35,83	33,1	A = 34,12	23,0	A = 22,31	16,3	A = 17,95
		B = 36,58		B = 34,80		B = 22,32		B = 18,02
<b>Cho</b>	34,4	A = 35,86	34,6	A = 33,70	22,7	A = 21,17	17,2	A = 18,45
		B = 32,67		B = 31,45		B = 23,68		B = 18,32

<sup>1</sup> Avaliação após 120 dias; <sup>2</sup> Avaliação após 180 dias; <sup>3</sup> Micro-organismos como *Nitrosomonas*; <sup>4</sup> Micro-organismos como *Nitrobacter*. Os sistemas destacados em cinza indicam significativas diferenças entre os sistemas A e B após 180 dias. As interações sublinhadas indicam que ocorreu aumento da biomassa após 180 dia comparados àquelas aos 120 dias.

Numa análise global, utilizando-se de *primers* universais para os genes que codificam o RNAr 16S para o Domínio *Bacteria*, observa-se que não ocorreram variações significantes na concentração de cópias de DNA entre as análises aos 120 dias de enriquecimento e após 180 dias testando-se a atividade anammox, interpretadas pelos valores dos ciclos de



quantificação (Cq) (Tabela 5.11). Dessa maneira, verifica-se a existência contínua de uma comunidade microbiana atuante nos sistemas biológicos, sendo a responsável pelas modificações das concentrações das espécies químicas analisadas.

Na análise dos resultados obtidos pela PCRq, percebe-se muito frágil a estabilidade das comunidades biológicas dos sistemas. A modificação no modo de operação, ainda que ajustados para promover o crescimento das concentrações dos micro-organismos do grupo anammox, no período avaliado, a abundância de cópias dos genes relacionados ao RNAr 16S foram expressivamente insignificantes frente às densidades dos grupos relacionados às bactérias como *Nitrobacter* e *Nitrosomonas*, bem como aos outros grupos de bactérias nos sistemas (Figura 5.29).

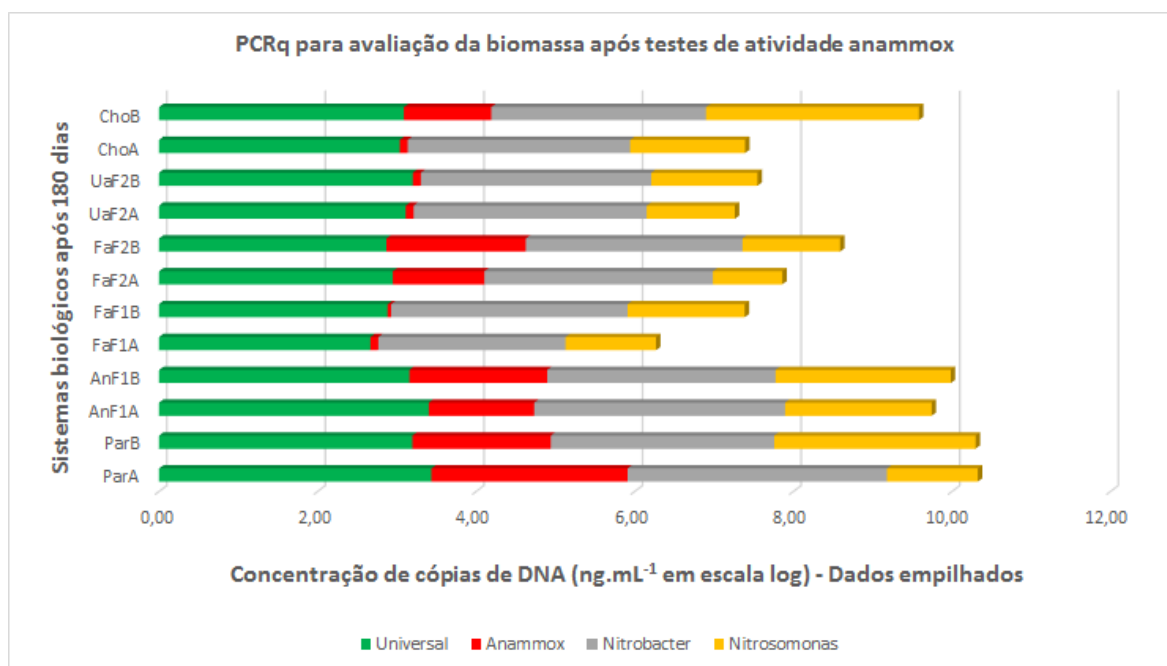


Figura 5.29: Abundância de cópias dos genes de micro-organismos de interesse na biomassa dos sistemas biológicos ajustados para permitir o enriquecimento e atividade de bactérias anammox.

As condições estabelecidas para operação dos sistemas biológicos, em modo de culturas em bateladas ajustadas para o enriquecimento e atividade de organismos anammox, selecionou os grupos de bactérias nos sistemas biológicos. Limitações dos substratos e, portanto, competições entre as bactérias foram provavelmente a principal força seletiva para o

estabelecimento da comunidade microbiológica nos sistemas biológicos. O ajuste de condições, tais como anaerobiose, temperatura em torno 30° C, água residuária sintética com concentrações altas de cloretos, modo de operação, não necessariamente excluíram bactérias nitrificantes dos sistemas.

Conforme resultados já obtidos pela interpretação dos ciclos de quantificação (Cq), as avaliações das concentrações de cópias de DNA dos genes dos micro-organismos de interesse confirmam que ocorreu aumento na abundância de cópias das bactérias capazes de oxidar anaerobicamente a amônia após o período de 180 dias nos sistemas ParA, FaF2B e ChoB quando comparados aos 120 dias destinados ao enriquecimento promovido na etapa 1 (Figura 5.30). As reduções nas concentrações de cópias de DNA nos demais sistemas biológicos podem ser explicadas pelas substituições de dominância das espécies anammox originalmente presentes nos inóculos por outras espécies dadas as condições estabelecidas para os sistemas e pelas interações competitivas. O modo operacional estabelecido para os sistemas biológicos, na etapa 2, pode também ter levado à uma nova estrutura da comunidade e onde as bactérias anammox provavelmente passam novo período de adaptação.

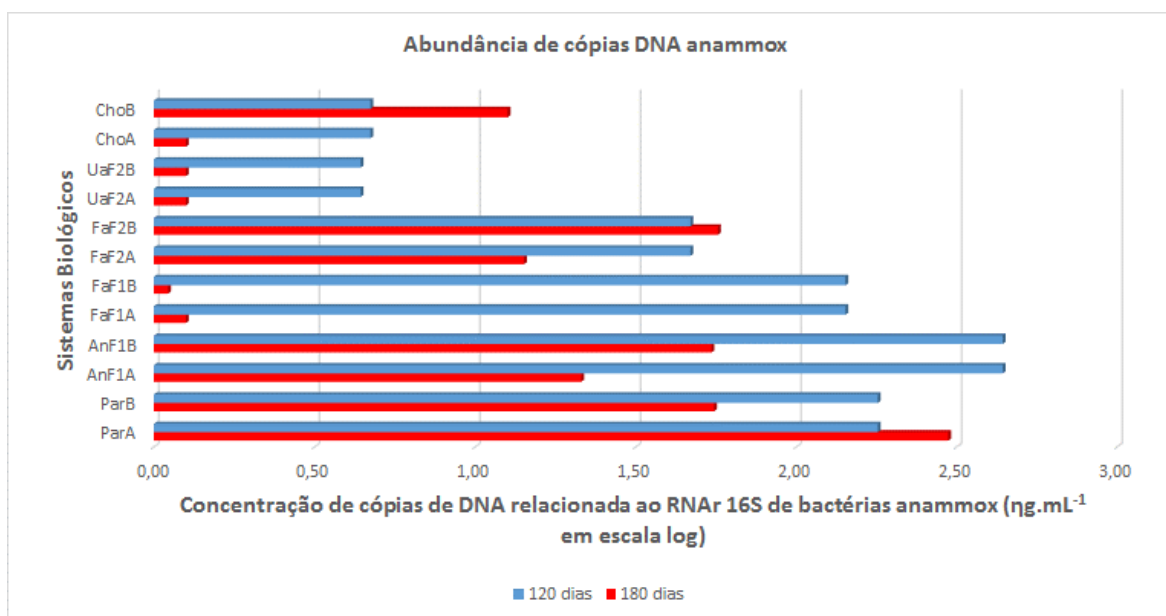


Figura 5.30: Concentrações de cópias de DNA relacionadas ao RNAr 16S de bactérias anammox nos sistemas biológicos aos 120 dias destinados ao enriquecimento e após o período de 180 dias destinados à atividade de micro-organismos anammox.

## 6 - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

\* Sugere-se a presença de micro-organismos anammox, verificadas por análise de PCR convencional utilizando *primers* para amplificação dos genes relacionados ao RNAr 16S e por sequenciamento dos fragmentos amplificados, nas biomassas provenientes do sedimento do lago Paranoá, Brasília, DF (Par), dos lodos das lagoas anaeróbia e facultativa tratando efluente do frigorífico 1, Araguari, MG (AnF1 e FaF1) e no lodo da lagoa facultativa tratando efluente do frigorífico 2, Uberlândia, MG (FaF2A).

\* Os resultados obtidos no alinhamento e comparação das sequências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA amplificados por PCR, usando o conjunto de *primers* Pla46F e Amx820R, indicam haver substituição de dominância dos grupos de bactérias anammox inicialmente presentes nos inóculos quando estabelecidos os sistemas e as condições de operação.

\* A aproximação filogenética das sequências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA amplificados por PCR, usando o conjunto de *primers* Pla46F e Amx820R, com às sequências das candidatas espécies anammox depositadas no *Genbank* utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) foi baixa. No entanto, os índices de similaridades calculados para essa comparação indicam que os fragmentos amplificados a partir da biomassa nos sistemas pertençam a Ordem Brocadiales.

\* Independentemente da origem do inóculo, as condições estabelecidas para os sistemas biológicas parecem selecionar o mesmo grupo de bactérias anammox nos sistemas, tendo-se concluído a partir da similaridade entre as sequências de bases dos fragmentos amplificados por PCR usando *primers* Pla46F e Amx820R específicos para o gene RNAr 16S de bactérias anammox.

\* O tipo de inóculo provavelmente influencia o *start-up* dos sistemas anammox de acordo com a abundância original da bactéria anammox que tornará dominantes nos sistemas biológicos, definidos os tipos de reatores e condições de operação. As características físico-químicas e da comunidade microbiana dos inóculos podem interferir no estabelecimento da atividade anammox dadas sua potencialidade de substâncias inibitórias e grupos de micro-organismos competidores por substratos.

- ✖ O tempo de partida de sistemas para atividade anammox são provavelmente longos devido à provável substituição de dominância entre as espécies anammox nos sistemas biológicos e o tempo requerido para o crescimento da densidade das bactérias anammox.
- ✖ A limitação de nitrito interferiu no sucesso do processo anammox, uma vez que as bactérias anammox tem menor afinidade por esse substrato e as bactérias nitratantes e heterotróficas desnitrificantes o consumiram mais rapidamente.
- ✖ Em todos os sistemas biológicos o metabolismo anammox não foi exclusivo, uma vez que não foram atendidos os índices estequiométricos esperados pelo metabolismo anammox. As conversões das formas nitrogenadas nos sistemas biológicos foram associadas à concomitância dos processos metabólicos anammox, nitrificação, nitratação e desnitrificação heterotrófica.
- ✖ A partida dos sistemas biológicos para atividade anammox ficou sujeita às densidades iniciais dos micro-organismos anammox que, por sua vez, apresentam baixas afinidades pelos substratos, podem ser inibidos por várias substâncias, apresentam taxas lentas de crescimento e à competição por substrato com outras bactérias.
- ✖ Os sistemas biológicos que foram inoculados com biomassas provenientes do sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF e do lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG apresentaram melhor performance da atividade anammox durante a etapa 1, correspondente a 120 dias de operação dos sistemas.
- ✖ Os inóculos utilizados e/ou as condições estabelecidas nesse estudo não favoreceram a redução do tempo de partida anammox nos sistemas biológicos. Como também verificado em outras pesquisas, o tempo de partida e estabilidade do processo pode ser superior a 200 dias de operação dos sistemas.

## RECOMENDAÇÕES

- ✦ Realizar a identificação filogenética dos grupos de bactérias anammox por meio de clonagem e posterior sequenciamento dos fragmentos obtidos a partir dos clones. Assim, construir a relação filogenética entre as sequências obtidas e aquelas depositadas no *Genbank* para as candidatas espécies anammox utilizando BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).
- ✦ Avaliar a dinâmica populacional das bactérias relacionadas ao ciclo do nitrogênio ao longo das etapas experimentais e avaliar a estrutura das comunidades microbiológicas, utilizando das ferramentas de biologia molecular como a PCR quantitativa e do DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).
- ✦ Avaliar as conversões das formas nitrogenadas por perfis temporais horários para uma melhor definição dos processos metabólicos predominantes ao longo das bateladas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abma, W.R; Driessen W.; Haarhuis R.; Loodrecht M.C.M. (2010). “Upgrading of sewage treatment plant by sustainable and cost-effective separate treatment of industrial wastewater”. In: *Water Science and Technology* 61 (7): 1715-1722.
- Ahn, Y. Ho. (2006). “Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review”. In: *Process Biochemistry*, 41: 1709-1721.
- Aiyuk S.; Forrez I.; Lieren D. K.; van Haandel A.; Verstraete W. (2006). “Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates. A review”. In: *Bioresource Technology*, 97 (17): 2225-2241.
- Alvarez-Vasquez, H.; Jefferson, B.; Judd, S. J. (2004). “Membrane bioreactors vs conventional biological treatment of landfill leachate: a brief review”. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79: 1043-1049.
- APHA. (2005). *Standard Methods for the examination of water and of wastewater*. By Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Rice, E.W.; Greenberg, A.E.; Frason, M.A.H. (eds). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation. 21<sup>th</sup> ed. USA.
- Anthoniesen, A. C.; Loehr, R. C. Prakasam, T. B. S.; Srinath, E. G. (1976). “Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid”. In: *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 48 (5): 835-851.
- Araújo, J. C.; Campos, A. P.; Correa, M. M. S.; Silva, E. C., Von Sperling, M.; Chernicharo, C. A. L. (2010). “Enriquecimento de bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia – Anammox”. In: *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 15 (2): 205-212.
- Araújo, J.C.; Campos, A.C.; Correa, M.M.; Silva, E.C.; Matte, M.H.; Matte, G.R.; Von Sperling, M.; Chernicharo, C.A. (2011). “Anammox bacteria enrichment and

characterization from municipal activated sludge”. In: *Water Science Technology*, 64 (7): 1428-1434.

Aslan, S.; Miller, L.; Dahab, M. (2009). “Ammonium oxidation via nitrite accumulation under limited oxygen concentration in sequencing batch reactors”. In: *Bioresouce Technology*, 100: 659-664.

Bae, H.; Park, K-Soon.; Chung, Yun-Chul; Jung, Jin-Young. (2010). “Distribution of anammox bacteria in domestic WWTPs and their enrichments evaluated by real-time quantitative PCR”. In: *Process Biochemistry*, 45: 323-334.

Bagchi, S.; Biswas, R.; Nandy, T. (2012). “Autotrophic Ammonia Removal Processes: Ecology to Technology”. In: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42 (13): 1353-1418.

Barbosa, J. S. B. (2010). *Remoção biológica de nitrogênio de lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos por nitrificação e desnitrificação via nitrito*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília. Brasília. 105p.

Bitton, G. (2005). *Wastewater Microbiology*, Wiley Liss Pub., New York, 449 p.

Boardman, G. D; Starbuck, S. M.; Hudgins, D. B; Li, X.; Kuhn, D. D. (2004). “Toxicity ammonia to three marine fish and three marine invertebrates”. In: *Environmental Toxicology*, 19 (2): 134-142.

Brandsma, J.; van de Vossenberg, J.; Risgaard-Petersen, N.; Schmid, M. C.; Engstrom, P.; Eurenium, K.; Hulth, S.; Jaeschke, A.; Abbas, B.; Hopmans, E. C.; Strous, M.; Schouten, S.; Jetten, M. S. and Damste, J. S. (2011). “A multi-proxy study of anaerobic ammonium oxidation in marine sediments of the Gullmar Fjord, Sweden”. In: *Environ Microbiol Rep.* 3 (3), 360-366.

Brasil. Resolução Conama nº 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março

de 2005, do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 de maio de 2011. Disponível em < <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646> >. Acesso em 20 setembro de 2014.

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

Bustin, S.E; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J. Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl M.W.; Shipley, G. L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C.T. (2009). “The MIQE Guidelines: “Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments”. In: *Clinical Chemistry* 55 (4): 611-622.

Callado, N. H.; Foresti, E. (2000). “Tratamento de esgoto doméstico com remoção de nitrogênio e fósforo em reatores seqüenciais em batelada”. In: *Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*. ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Chamchoi, N.; Nitorisavut, S. (2007). “Anammox enrichment from different conventional sludges”. In: *Chemosphere*, 66: 2225–2232.

Chen, H.; Liu, S.; Yang, F.; Xue, Y.; Wang, T. (2009). “The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal”. In: *Bioresource Technology*, 100: 1548-1554.

Comeau, Yvès. (2008). “Microbial Metabolism”. In: Henze, M.; van Loosdrescht, M.C.M.; Ekama, G.A.; Brdjanovic, D. (eds.): *Microbial Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*, IWA Publishing. London, UK.

Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal – CAESB, (2003). Plano de Gestão e Preservação do Lago Paranoá – Produto 01: Levantamento, Caracterização, Evolução e Situação Atual. Brasília – DF, 289p.



Companhia Energética de Brasília – CEB, (2010). Usina do Paranoá – Dados Compilados. Brasília – DF, 10p.

Costa, M. C. M. S. (2013a). *Impacto do tipo de inóculo e das condições operacionais sobre a estrutura da comunidade bacteriana e desempenho do processo ANAMMOX em biofiltros usando espuma de poliuretano como meio suporte dos microrganismos*. Tese de Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG, 107 p.

Costa, M. E. L. (2013b). *Monitoramento e modelagem das águas da drenagem urbana na bacia do lago Paranoá*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH.DM-148/2013, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 179p.

Costa, M. C. M. S.; Carvalho, L.; Leal, C. D.; Dias, M. F.; Martins, K. L.; Garcia, G. B.; Mancuello, I.; Hipolito, T.; Abreu, E. F.; Okada, D.; Etchebehere, C.; Chernicharo, C. A. L.; Araújo, J. C. (2014). “Impact of inocula and operating conditions on the microbial community structure of two anammox reactors”. In: *Environmental Technology*, p. 1-12.

Dapena-Mora, A.; Campos, J. L.; Mosquera-Corral, A.; Jetten, M. S. M.; Méndez, R. (2004). “Stability of the Anammox process in a gas-lift reactor and a SBR”. In: *Journal of Biotechnology*, 110: 159-170.

Dang, H.; Zhou, H.; Zhang, Z.; Yu, Z.; Hua, E.; Liu, X.; Jiao, N. (2013). “Molecular detection of *Candidatus Scalindua pacifica* and environmental responses of sediment Anammox bacterial community in the Bohai Sea, China”. In: *PLoS One*, 8 (4): e61330.

Date, Y.; Isaka, K.; Ikuta, H.; Sumino, T.; Kaneko, N.; Yoshie, S.; Tsuneda, S.; Inamorim Y. (2009). “Microbial diversity of anammox bacteria enriched from different type of seed sludge in an anaerobic continuous-feeding cultivation reactors”. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107 (3): 281-286.

- Dijkman, H.; Strous, M. (1999). "Process for ammonium removal from wastewater". PCT/NL99/00446.
- Egli, K.; Langer, C.; Siegrist, H-R.; Zehnder, A. J. B.; Wagner, M.; van der Meer, J. R. (2003). "Community Analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors". In: *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3213-3222.
- Egli, K.; Bosshard, F.; Werlen, C.; Lais, P.; Siegrist, H.; Zehnder, A. J.; van der Meer, J. R. (2003). "Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon". In: *Microbiology Ecology*, 45: 419-432.
- Fdz-polanco, F.; Fdz-polanco, M.; Fernandez, N.; Urueña, M.A.; Garcia, P.A.; Villaverde, S. (2001). "New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions". In: *Water Research*, 35 (4): 1111-1114.
- Field, Andy. (2009). *Descobrimo a estatística usando o SPSS*. 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 688p.
- Fuchsman, C.A.; Staley, J.T.; Oakley, B.B.; Kirkpatrick, J.B.; Murray, J.W. (2012). "Free-living and aggregate-associated Planctomycetes in the Black Sea". In: *FEMS Microbiol. Ecol.*, 80: 402-416.
- Ganigué, R.; López, H.; Balaguer, M. D.; Colprim, J. (2007). "Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates". In: *Water Research*, 41: 3317-3326.
- Gao, D.; Tao, Y. (2011). "Versatility and application of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria". In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91: 887-894.
- Governo do Distrito Federal – GDF (2012a). Revisão e Atualização do Plano de Gerenciamento Integrado de Recursos Hídricos do Distrito Federal –Volume I Diagnóstico. Brasília – DF, 830.

- Governo do Distrito Federal – GDF (2012b). Revisão e Atualização do Plano de Gerenciamento Integrado de Recursos Hídricos do Distrito Federal –Volume II Prognóstico e Programas de Ação. Brasília – DF, 1094.
- Hair, J.F.; Anderson, R.E.; Tatham, R.L.; Black, W.C. (2005). *Análise multivariada de dados*. 5ª edição. Porto Alegre: Bookman, 593p.
- Hasler, A.D.; Swenson, M.E. (1967). “Eutrophication”. In: *Science*, 158 (3798): 278-283.
- Hellinga, C.; Schellen, A.A.J.C.; Mulder, J.W.; van Loosdrecht, M.C.M.; Heijnen, J.J. (1998). “The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water”. In: *Water Science and Technology*, 37 (9): 135-142.
- Henze, Mogens. (2008). “Wastewater Treatment Development Biological”. In: Henze, Mogens; van Loosdrecht, Mark.C.M; Ekama, George.A.; Brdjanovic, Damir (eds). *Wastewater Treatment: Principals, Modellind and Design*. IWA Publishing. London, UK.
- Hirsch, Matheus D.; Long, Zachery T.; Song, Bongkeun (2011). “Anammox Bacterial Diversity in Various Aquatic Ecosystems Based on the Detection of Hydrazine Oxidase Genes (hzoA/hzoB)”. In: *Microbial Ecology*, 61: 264–276.
- Hu, Ba-lan; Zheng, Ping; Tang, Chong-jian; Chen, Jian-wei; van der Biezen, Erwin; Zhang, Lei; Ni, Bing-jie; Jetten, Mike S.M.; Yan, Jia; Yu, Han-Qing; Kartal, Boran. (2010). “Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors”. In: *Water Research*, 44: 5014-5020.
- IRAR (2008). *Gestão e tratamento de lixiviados produzidos em aterros sanitários de resíduos sólidos*. Relatório do Instituto Regulador de Águas e Resíduos, IRAR 03 - 2008. Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Isaka, K.; Sumino T. (2007). “Apparatus for removing nitrogen”. US 2007/7267764, (11/09/2007).

- Isoldi, L. A.; Koetz, P. R.; Faria, O. L. V. (2003). "Remoção de carbono orgânico e nitrificação de águas residuárias da industrialização de arroz". In: *Revista Brasileira de Agrociência*, 9: 273-277.
- Jeison; D.; Chamy, R. (1998). "Novel technique for measuring the size distribution of granules from anaerobic reactors for wastewater treatment". In: *Water Science and Biotechnology*, 37: 135-142.
- Jenni, S.; Vlaeminck, S.; Morgenroth, E.; Udert, K. M. (2014). "Successful application of nitritation/anammox to wastewater with elevated organic carbon to ammonia ratios. In: *Water Research*, 49: 316-326.
- Jetten, M.; Schmid, M.; van de Pas-Schoonen, K.; Sinningle, D.; Strous, M. (2005). "Anammox organisms: enrichment, cultivation and environmental analysis". In: *Methods in Enzymology*, 397: 34-57.
- Jetten, M.; Strous, M. van de Pas-Schoonen, K.; Schalk, J.; van de Graaf, A. A.; Logemann, S.; Muyzer, G.; van Loosdrecht, M. C. C.; Kuenen, J. G. (1999). "The anaerobic oxidation of ammonium". In: *FEMS Microbiology Reviews*, 22: 421-437.
- Jetten, M. S. M.; Niftrik, L. V. V.; Strous, M.; Kartal, B.; Keltjens, J. T.; Op Den Camp, H. J. (2009). "Biochemistry and molecular biology of Anammox bacteria. Critical reviews". In: *Biochemistry and Molecular Biology*, 44: 65-84.
- Jetten, J.S.M., Op den Camp, H.J.M., Kuenen, J.G., and Strous, M. "Family I. 'Candidatus Brocadiaceae' fam. nov." In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 4 (The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes) (N.R. Krieg, J.T. Staley, D.R. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig, and W.B. Whitman, eds.), Springer-Verlag, New York (2011). pp. 918-925.
- Jin, Ren-Cun; Yang, Guang-Feng; Yu, Jin-Jin; Zheng, Ping. (2012). "The Inhibition of the

Anammox process: a Review”. In: *Chemical Engineering Journal*, 197: 67-79.

Jogler, C.; Waldmann, J.; Huang, X.; Jogler, M.; Glöckner, Frank O.; Mascher, T.; Kolter, R. (2012). “Identification of Proteins Likely To Be Involved in Morphogenesis, Cell Division, and Signal Transduction in *Planctomyces* by Comparative Genomics”. In: *Journal of Bacteriology*, 194 (23): 6419-6430.

Jordão, E. P.; Pessoa, C. A. (2005). *Tratamento de Esgotos Domésticos*. 4ª edição. Rio de Janeiro: ABES - Depto de Recursos Hídricos e Meio Ambiente, Escola Politécnica, UFRJ. 932p.

Kartal, B.; Rattray, J.; van Niftrick, L. A.; van de Vossenberg, J. Schmid, M. C. Webb, R. J.; Schouten, S.; Fuerst, J. A. Damste, J. S. S.; Jetten, M. S. M.; Strous, M. (2007). “*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria”. In: *Systematic and Applied Microbiology*, 30 (1): 39-49.

Kartal, B.; Geerts, W.; Jetten, M. S. (2011). “Cultivation, detection and ecophysiology of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria”. In: *Methods in Enzymology*, 486: 89-108.

Kartal, B.; van Niftrik, L.; Keltjens, J. T.; Op den Camp, H. J. M.; Jetten, M. S. M. (2012). Anammox-Growth Physiology, Cell Biology, and Metabolism. In: Robert K. Poole (editor): *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 60, Burlington: Academic Press, pp. 211-262.

Kalyuzhnyi, S.V.; Gladchenko, M.; Mulder, A.; Versprille, B. (2009). “DEAMOX: New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide driven conversion of nitrate into nitrite”. In: *Water Resource*, 40: 3637-3645.

Kalyuzhnyi, S.V.; Gladchenko, M. (2009). “DEAMOX: New microbiological process of nitrogen removal from strong nitrogenous wastewater”. In: *Desalination*, 248: 783-793.

- Kayyuzhnyi, S.V.; Shestakova, N.M.; Tourova, T.P.; Poltarau, A.B.; Gladchenko, M.A.; Trukhina, A.I.; Nazina, T.N. (2010) “Phylogenetic analysis of a microbial community involved in anaerobic oxidation of ammonium nitrogen”. In: *Mikrobiologia*, 79 (2): 237-246.
- Khin, T.; Annchhatre, A.P. (2004). “Novel microbial nitrogen removal process”. In: *Biotechnology Advances*, 22 (7): 517-532.
- Kim, D-J.; Lee, D-I; Keller, J. (2006). “Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH”. In: *Bioresources Technology*, 97: 459-468. 2006.
- Kuai, L.; Verstraete, W. (1998). “Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system”. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (11): 4500-4506.
- Kunz, A.; Vanotti, M.; Szogi, A.; Gonzales, M. C. G.; Schierholt Neto, G. F.; Soares, H. M. (2007). “Development of Anammox process for animal waste treatment: Experiences in Brazil”. In: *International Symposium on Air Quality and Waste Management for Agriculture*, 2007, Broomfield, Colorado. CD-Rom Proceedings: ASABE, Publication Number 701P0907cd.
- Kuypers, M.M.; Sliemers, A.O.; Lavik, G.; Schmid, M.; Jorgensen, B. B.; Kuenen, J.G.; Sinninghe-Damste, J.S.; Strous, M.; Jetten, M.S.M. (2003). “Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea”. In: *Nature* 422 (6932): 608-611.
- Lackner, S.; Gilbert, E.M.; Vlaeminck, S.E.; Joss, A.; Horn, H.; van Loosdrecht, M.C.M. (2014). “Full-scale partial nitrification/anammox experiences – An application survey”. In: *Water Research* 55: 292-303.
- Lackner, Susanne; Lindenblatt, Claus, Horn, Harald, Horn. (2012). “Swinging ORP as operation strategy for stable reject water treatment by nitrification-anammox in sequencing batch reactors”. In: *Chemical Engineering Journal*, 180: 190-196.

- Lan, Chien-Ju; Kumar, Mathava; Wang, Chih-Cheng; Lin, Jih-Gaw. (2011). "Development of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a sequential batch reactor". In: *Bioresource Technology*, 102: 5514-5519.
- Li, A.; Sun, G.; Xu, M. (2008). "Recent patents on anammox process". In: *Recent Patents on Engineering* 2: 189-194.
- Li, H.; Zhou, S.; Ma, W.; Huang, G.; Xu, B. (2012). "Fast start-up of anammox reactor: operational strategy some characteristics as indicators of reactor performance". In: *Desalination* 286: 436-441.
- Li, M.; Cao, H.; Hong, Y. Gu, Ji-D. (2011). "Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments". In: *Applied Microbiology Biotechnology*, 89 (4): 1243-2154.
- Liang, Z.; Liu, J. (2007). "Control factor of partial nitrification for landfill leachate treatment". In: *Journal of Environmental Sciences*, 19: 523-529.
- Liang, Z.; Liu, J. (2008). "Landfill leachate treatment with a novel process: Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) combined with soil infiltration system". In: *Journal of Hazardous Materials* 151: 202-212.
- Li-dong, Shen; An-hui, Hu; Ren-cun, Jin; Dong-qing, Cheng, Ping, Zheng; Xiang-yang, Xu; Bao-lan, Hu. (2012). "Enrichment of bacteria from three sludge sources for the startup of monosodium glutamate industrial wastewater treatment system". In: *Journal of Hazardous Material*, 199-200: 193-199.
- Lindsay, M.R.; Webb, R.I.; Strous, M.; Jetten, M.S.; Butler, M.K.; Forde, R.J.; Fuerst, J.A. (2001). "Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell". In: *Archives Microbiology*, 175: 413-429.
- Liporoni, L. M. (2012). *Estudo preliminar da qualidade da água do Lago Paranoá, Brasília – DF, utilizando um modelo de qualidade de água bidimensional*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH.DM–

138/2012, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 188p.

Liu, S.; Yang, F.; Gong, Z.; Meng, F.; Chen, H.; Xue, Y.; Furukawa, K. (2008). “Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal”. In: *Bioresource Technology*, 99: 6817-6825.

Ludwig, W., Euzéby, J., and Whitman, W.B. In: N.R. Krieg, J.T. Staley, D.R. Brown, B.P. Hedlund, B.J. Paster, N.L. Ward, W. Ludwig, and W.B. Whitman (eds.). (2011) Road “Map of the *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*”. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 4, 2nd ed., Springer, New York, pp. 1-24.

Maier, R.M.; Pepper I. L.; Gerba, C. P. (2009). *Environmental Microbiology*. Academic Press/Elsevier. 2ª edição. 598p.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V.; Clark, D. P. (2010). *Microbiologia de Brock*. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 1160p.

Maroco, J. (2007). *Análise estatística com utilização do SPSS*. 3ª Edição, Lisboa: Edições Sílabo, Lda. 822p.

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

Metcalf & Eddy, Inc. (1991). *Wastewater Engineering. Treatment, Disposal and Reuse*. Inc. Revisado Tchobanoglous, G.; Burton, F. L. 3ª edição. McGraw-Hill, Inc. 1334p.

Mulder, A. (1992). “Anoxic Ammonia Oxidation”. US/1992/5078884, (07/01/1992).

Mulder, A.; van de Graaf, A. A.; Robertson, L. A.; Kuenen, J. G. (1995). “Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor”. In: *FEMS*



*Microbiology Ecology*, 16: 177-184.

Muñoz, J. C.L.; Babero, F. S.; Molist, J. S. (2007). “Anàlisi comparativa dels processos emergents sharon i anammox per al tractament d’aigües amb una alta càrrega de nitrogen”. In: *Ciències Ambientals*. Disponible em: <http://hdl.handle.net/10256/76>.

Ni, B.J.; Zeng, R.J.; Fang, F.; Xie, W.M.; Xu, J.; Sheng, G.P.; Sun, Y.J.; Yu, H.Q. (2011). “Evaluation on factors influencing the heterotrophic growth on the soluble microbial products of autotrophs”. In: *Biotechnology and Bioengineering* 108: 804-812.

Ni, B.J.; Rusalleda, M.; Smets, B. F (2012). “Evaluation on the microbial interactions of anaerobic ammonium oxidizers and heterotrophs in Anammox biofilm”. In: *Water Research*, 46: 4645-4652.

Okabe, S.; Hiratia, K.; Ozawa, Y.; Watanabe, Y. (1996). “Spatial microbial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed populations biofilms”. In: *Biotechnology and Bioengineering*, 50: 24-35.

Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H. and Okabe, S. (2011) “Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium '*Candidatus Brocadia sinica*'. In: *Microbiology* 157 (6), 1706-1713.

Pacheco, J. W.; Yamanaka, H. T. (2006). *Guia técnico ambiental de abates (suínos e bovinos)*. São Paulo: CETESB, 98p.

Park, H.; Rosenthal, A. Ramalingam, K.; Fillos, J. Chandran, K. (2010). “Linking community profiles, gene expression and N-removal in anammox bioreactors treating municipal anaerobic digestion reject water”. In: *Environmental Science & Technology*, 44(16): 6110-6116.

Park, H.; Rosenthal, A.; Jesek, R.; Ramalingam, K.; Fillos, J.; Chandran, K. (2010). “Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial ecology of anaerobic ammonia oxidation (anammox) bioreactor communities”. In: *Water Research*, 44: 5005-5013.

- Peng, Y.; Zhu, G. (2006). "Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway". In: *Applied Microbiology Biotechnology*, 73: 15-26.
- Porto, M. F. A. (1995). "Aspectos qualitativos do escoamento superficial em áreas urbana". In: Tucci, C.E.M.; Porto, R. L. L.; Barros, M. T. (Eds). *Drenagem Urbana*. Porto Alegre: ABRH/Editora da Universidade/UFRS. 387-414. 228p.
- Philomeno, M. G. 2007. *A comunidade fitoplanctônica e a restauração do Lago Paranoá, Brasília-DF*. Teses de Doutorado em Ecologia, Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 223 p.
- Quan, S. X.; Rhee, S. K.; Zuo, J. E.; Yang, Y.; Bae, J. W.; Park, J. R.; Lee, S. T. Park, Y. H. (2008). "Diversity of ammonium-oxidising bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor". In: *Environmental Microbiology*, 10 (11): 3130-3139.
- Reginato, V.; Teixeira, R. M.; Pereira, F.; Schmidell, W.; Furigo Jr. A.; Menes, R.; Etchebehere, C.; Soares, H.M. (2005). "Anaerobic ammonium oxidation in a bioreactor treating slaughterhouse wastewater". In: *Brazilian J. of Chemical Engineering* 22 (4): 593-600.
- Rosselló-Mora, R.; Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. In: *FEMS Microbiology Reviews* 25: 39-67.
- Rothrock, M.J. Jr., Vanotti, M.B., Szogi, A.A., Garcia Gonzales, M.C., and Fuji, T. (2011). "Long-term preservation of anammox bacteria." In: *Applied Microbiology Biotechnology* 92:147-157.
- Sánchez, J.; Sanabria, J.; Jetten, M. 2014. "Faster autotrophic growth of anaerobic ammonium oxidizing microorganisms in presence of nitrite, using inocula from Colombia". In: *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVI (1): 146-152.
- Sánchez-Melsió, A.; Cáliz, J.; Balaguer, M. D.; Colprim, J.; Vila, X. (2009). "Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural

and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems”. In: *Chemosphere*, 75: 169-179.

Sanz, Jose L; Kochling, Thorsten. (2007). “Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview”. In: *Process Biochemistry*, 42 (2): 119-133.

Scheeren, M. B.; Kunz, A.; Steinmetz, R. L. R.; Dressler, V. L. (2011). “O processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de águas residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio”. In: *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 15 (12): 1289-1297.

Schierholt Neto, G. F. (2007). *Desenvolvimento de uma flora de micro-organismos oxidadores anaeróbios de amônia utilizando inóculos provenientes de dejetos suínos*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 99p.

Schmid, M.C.; Hooper A.B; Klotz M.G., Woebken, D., Lam P., Kuypers, M.M.M, Pommerening-Roeser, A.; op den Camp, H.J.M.; Jetten M.S.M. (2008). “Environmental detection of octahem cytochrome c, hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria”. In: *Environmental Microbiology*, 10: 3140-3149.

Schmid, M.C.; Maas, B.; Dapena, A.; van de Pas-Schoonen; K.; van de Vossenberg J.; Kartal, B.; van Niftrik, L.; Schmidt, I.; Cirpus, I.; Kuenen, J. G.; Wagner, M.; Damsté, J. S. S., Kuypers, M.; Revsbech, N. P.; Mendez, R., Jetten, M. S. M.; Strous, M. (2005). “Mini review - biomarker for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria”. In: *Applied Environmental Microbiology*, 71: 1677-1684.

Schmid, M.C; Schimitz-Esser, S.; Jetten, M.; Wagner, M. (2001). “16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection”. In: *Environmental Microbiology* 3 (7): 450-459.

- Schmid, M.C, Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J.W., Schleifer, K.H., and Wagner, M. (2000). "Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation." In: *Syst. Appl. Microbiol.*, 23:93-106.
- Schmid, M.C; Walsh, K.; Webb, R.; Rijpstra, W.I.; van de Pas-Schoonen, K.; Verbruggen, M.J.; Hill, T.; Moffett, B; Fuerst, J.; Schouten, S.; Damste, J.S.; Harris, J.; Shaw, P.; Jetten, M.; Strous, M. (2003). Candidatus *Scalindua brodae*, sp. nov., Candidatus *Scalindua wagneri*, sp. nov, two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria". In: *Systematic Applied Microbiology*, 26 (4): 529-538.
- Schmidt, Ingo; Sliekers Olav; Schmid, Markus; Bock, Eberhard; Fuerst, John; Kuenen, J. Gijs; Jetten, Mike S.M.; Strous, Marc. (2003). "New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater". In: *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 481-492.
- Silva-Pereira, I. (2003). Amplificação de DNA por PCR. In. Azevedo, M. O.; Felipe, M. S. S.; Brigido, M. M.; Maranhão, A. Q.; Souza, M. T. (orgs). *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. Editora Universidade de Brasília. Brasília. 212p.
- Sliekers, A.O; Derwort, N., Campos Gomes, J.L.; Strous, M. Kuenen, J.G.; Jetten, M.S.M. (2002). "Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor". In: *Water Research*, 36: 2475-2482.
- Sliekers, A. O.; Haaijer, S. C. M.; Stafsnes, M. H. Kuenen J. G.; Jetten, M. S. M. (2005). "Competition and coexistence of aerobic ammonium- and nitrite-oxidizing bacteria at low oxygen concentrations". In: *Applied Microbiology Biotechnology*, 68: 808-817.
- Sonthiphand, P.; Hall, M.W.; Neufeld, J. D. (2014). "Biogeography of anaerobic ammonia-oxidizing (anammox) bacteria". In: *Frontiers in Microbiology*, 5 (399): 1-14.
- Souza, F.P. (2014). *Monitoramento e modelagem hidrológica da sub-bacia do Lago Paranoá - Brasília/DF - e avaliação de bacias de retenção*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH.DM-165/2014,

Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 139p.

Strous, M.; Fuerst, J.; Kramer, E.; Logemann, S.; Muyzer, G.; Van de Pas, K.; Webb, R.; Kuenen, J.; Jetten, M. S. M. (1999 a). "Missing lithotroph identified as new planctomycete". In: *Nature*, 400: 446 a 449.

Strous, M.; Heijnen, J.J.; Kuenen, J.G.; Jetten, M.S.M. (1998). "The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms". In: *Applied Microbiology Biotechnology*, 50 (5): 589-596.

Strous, M.; Kuenen, J. G.; Jetten, M. S. M. (1999 b). "Key physiology of anaerobic ammonium oxidation". In: *Applied Microbiology Biotechnology*, 65: 3248-3250.

Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Truong, C., Medigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dutilh, B.E., Op den Camp, H.J., van der Drift, C., Cirpus, I., van de Pas-Schoonen, K.T., Harhangi, H.R., van Niftrik, L., Schmid, M., Keltjens, J., van de Vossenberg, J., Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M.A., Mewes, H.W., Weissenbach, J., Jetten, M.S., Wagner, M., and Le Paslier, D. (2006). "Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome." In: *Nature* 440:790-794.

Strous, M.; Van Gerven, E.; Ping, Z.; Kuenen, J. G.; Jetten, M.S.M. (1997). "Ammonium removal from concentrated waste streams with Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) process in different reactor configuration". In: *Water Research*, 31: 1955-1962.

Sun, W.; Banihani, Q.; Sierra-Alvarez, R.; Field, J.A. (2011). "Stoichiometric and molecular evidence for the enrichment of anaerobic ammonium oxidizing bacteria from wastewater treatment plant sludge samples". In: *Chemosphere*, 84: 1262-1269.

- Suneethi, S.; Joseph, K. (2011). "Batch culture enrichment of anammox populations from anaerobic and aerobic seed cultures". In: *Bioresource Technology*, 102: 585-591.
- Takenaka, N.; Daimon, T.; Ueda, A.; Sato, K.; Kitano, M. Bandon, H.; Maeda, Y. (1998). "Fast oxidation reaction of nitrite by dissolved oxygen on the freezing process in the tropospheric aqueous phase. In: *Journal of Atmospheric Chemistry* 29, 135-150.
- Tao, Y.; Gao, D.W.; Wang, H.Y.; Kreuk, M.; Ren, N.Q. (2013). "Ecological characteristics of seeding sludge triggering a prompt start-up of anammox". In: *Bioresource Technology*, 133: 475-481.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0". In: *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.
- Terada, A.; Zhou, S.; Hosomi, M. (2011). "Presence and detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and appraisal of anammox process for high-strength nitrogenous wastewater treatment: a review". In: *Clean Technologies and Environmental Policy*, publicação online.
- Third, K. A.; Olav Sliemers, A.; Kuenen, J. G.; Jetten, M. S. M. (2001). "The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under ammonium limitation: Interaction and Competition between three groups of Bacteria". In: *Systematic Applied Microbiology* 24: 588-596.
- Tomaz, P. 2011. Remoção de sedimentos em BMPs (Best Management Practices). 278 p. disponível em: <[http://www.pliniotomaz.com.br/downloads/livros/livro\\_remocao/livro\\_re\\_mocao\\_sedimentos.pdf](http://www.pliniotomaz.com.br/downloads/livros/livro_remocao/livro_re_mocao_sedimentos.pdf)> Acesso em 25 de janeiro de 2015.
- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C.L. (2005). *Microbiologia*. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 894p.
- Tsushima, I.; Kindaichi, T.; Okabe, S. (2007a). "Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR". In: *Water Research*, 41:

785-794.

- Tsushima, I.; Ogasawara, Y.; Kindaichi, T.; Satoh, H.; Okabe, S. (2007b). "Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors". In: *Water Research*, 41: 1623-1634.
- Udert, K. M.; Larsen, T.A.; Gujer, N. (2005). "Chemical nitrite oxidation in acid solutions as a consequence of microbial ammonium oxidation. In: *Environmental Science & Technology*, 39: 4066-4075.
- van de Graaf, A.A.; De Bruijn, P.; Robertson, L.A.; Jetten, M.S.M.; Kuenen, J.G. (1996). "Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in fluidized bed reactor". In: *Microbiology*, 142: 2187-2196.
- van der Star, W.; Abma, W.R.; Blommers, D.; Mulder J.W.; Tokutomi, T.; Strous, M.; Picioreanu, C.; van Loosdrecht, M.C.M.; 2007. "Startup of reactor for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox in Rotterdam". In: *Water Research*, 41 (18): 4149-4163.
- van de Vossenberg, J.; Rattray, J.E.; Geerts, W.; Kartal, B.; van Niftrik, L.; van Donselaar, E.G.; Jaap, S.; Damsté, S.; Strous, M.; Jetten, M.S.M. (2008). Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production. In: *Environ.Microbiol.*, 10: 3120-3129.
- van Hulle, S.W.H.; Vandeweyer, H.J.P.; Meesschaert, B.D.; Vanrolleghem, P.A.; Dejans, P. and Dumoulin, A. 2010. "Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams". In: *Chemical Engineering Journal*, 162:1–20.
- van Loosdrecht, M.C.M; Jetten, M.S.M. (1997). "Method of treating ammonia comprising wastewater". PCT/NL97/00482 (25/08/1997).
- Vanotti, M.B., Szogi, A., and Rothrock, M.J. Jr. "Novel anammox bacterium isolate." US Patent Application S/N 13/013,874, filed 1/26/2011."US Patent and Trademark Office,

Washington, DC. (2011)

Vives, M. T.; Gonzáles, E.; López, H.; Ganigué, R.; Rusculleda, M.; Balaguer, M.D.; Colprim, J.; Jiménez; Elorduy, M. (2007). "Clonic: Closing the nitrogen cycle from landfill leachates. A biological process with partial nitrification and anammox followed by thermal dry treatment". In: *Proceedings Sardinia 2007, Eleventh International Waste Management and landfill Symposium*.

Vlaeminck, S.E.; Hay, A.G.; Maignien, L.; Verstraete, W. (2011). "In quest of the nitrogen prokaryotes of the early Earth". In: *Environmental Microbiology*, 13 (2): 283-295.

Wang, C-C.; Lee, P-H.; Kumar, M.; Huang, Y-T.; Sung, S.; Lin, J-G. (2010). "Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant". In: *Journal of Hazardous Materials*, 175: 622-628.

Windey, K.; De Bo, I.; Verstraete, W. (2005). "Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater". In: *Water Research* 39: 4512-4520.

Wobken, D.; Lam, P.; Kuypers, M.M.; Naqvi, S.W.; Kartal, B.; Strous, M.; Jetten, M.S.M.; Fuchs, B.M.; Amann, R. (2008). "A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua phylotype* in marine oxygen minimum zones". In: *Environmental Microbiology* 10 (11): 3106-3119.

World Health Organization, WHO. (2011). Nitrate and Nitrite in Drinking-water. WHO/SDE/WSH/07.01/16/REV/1. 23p. disponible em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/nitratenitrite2ndadd.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/nitratenitrite2ndadd.pdf)>.

Yossef, N. H.; Couger, M. B.; McCully, A. L.; Guerrero Criado, A. E.; Elshahed, M.S. (2014). "Assessing the global phylum level diversity within the bacterial domain: a Review". In: *Journal of advanced Research* disponible em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2014.10.005>>.

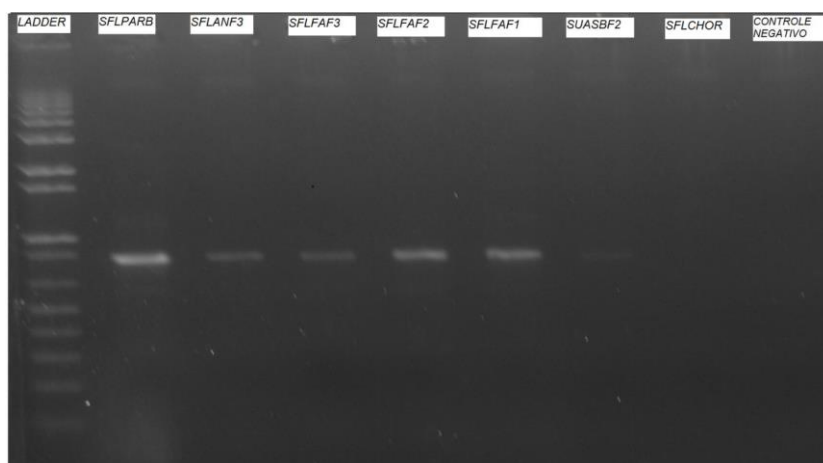


## APENDICE I

Análise de PCR e avaliação do sucesso de extração de DNA e das ampliações em eletroforeses em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

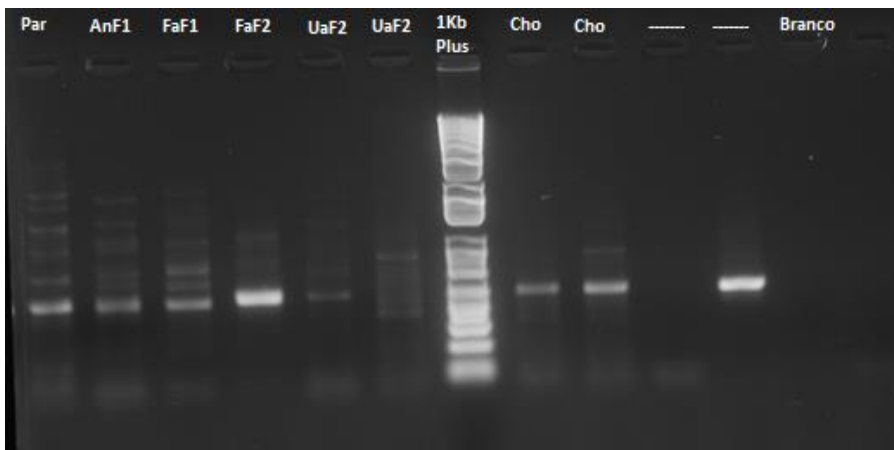


Figura 5.1: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para avaliação do DNA genômico extraído dos seis inóculos utilizados nos experimentos em bateladas para enriquecimento anammox. **Par**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF (SFLPAB); **AnF1**: lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG (SFLANF3); **FaF1**: lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG (SFLFAF3); **FaF2**: lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG (SFLFAF2); **UaF2**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG (SUASBF2); **CHOR**: sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF (SFLCHOR).



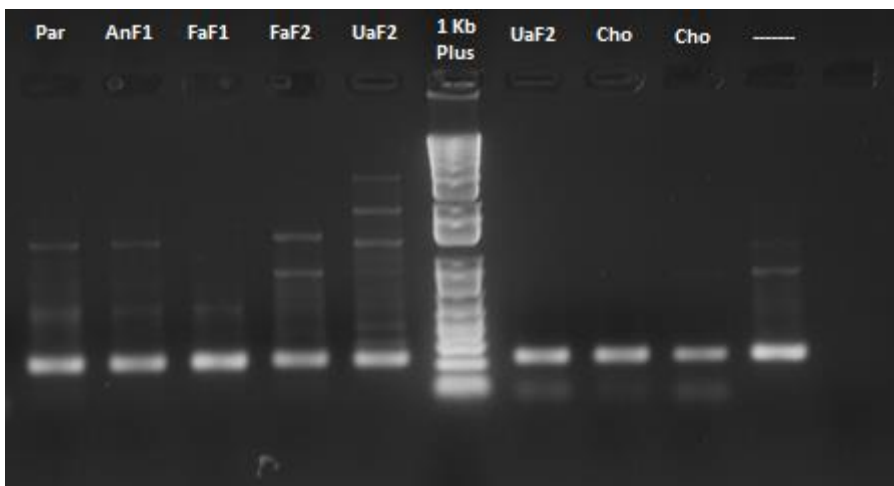
**Legenda:** **SFLPAB**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF (**Par**); **SFLANF3**: lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG (**AnF1**); **SFLFAF3**: lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG (**FaF1**); **SFLFAF2**: lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG (**FaF2**); **SUASBF2**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG (**UaF2**); **SFLCHOR**: sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF (**Cho**).

Figura 5.2: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para avaliação de fragmentos amplificados de aproximadamente 774 pb, a partir da biomassa dos inóculos testados nos experimentos em bateladas para enriquecimento anammox, com os pares de *primers* Pla 46F e Amx 820R.



**Legenda:** **Par:** sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1:** lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1:** lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2:** lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2:** lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **CHOR:** sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF.

Figura 5.3: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para avaliação de fragmentos de DNA amplificados de aproximadamente 650 pb, a partir das biomassas dos inóculos testados nos experimentos em bateladas para enriquecimento anammox, com os pares de *primers* AmoAF e AmoAR, para micro-organismos como *Nitrossomonas*.



**Legenda:** **Par:** sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1:** lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1:** lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2:** lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2:** lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **CHOR:** sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF.

Figura 5.4: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para avaliação de fragmentos de DNA amplificados de aproximadamente de 225 pb, a partir das biomassas dos inóculos testados nos experimentos em bateladas para enriquecimento anammox, com os pares de *primers* Nitro 1198Fe Nitro 1423R para micro-organismos como *Nitrobacter*.

## APENDICE II

Testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para testar a distribuição dos dados obtidos nas conversões dos íons amônia, nitrito e nitrato para a etapa 1.

### Sistemas Biológicos PaA e PaB

#### Testes de Normalidade

Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Amônia	PaA	,268	12	,018	,874	12	,073
	PaB	,173	12	,200*	,942	12	,518
Nitrito	PaA	,241	12	,053	,911	12	,220
	PaB	,242	12	,051	,916	12	,252
Nitrato	PaA	,155	12	,200*	,929	12	,369
	PaB	,163	12	,200*	,918	12	,271

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Sistemas Biológicos AnF1A e AnF1B

#### Testes de Normalidade

Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Amônia	AnF1A	,245	12	,045	,770	12	,004
	AnF1B	,272	12	,015	,822	12	,017
Nitrito	AnF1A	,121	12	,200*	,952	12	,661
	AnF1B	,165	12	,200*	,929	12	,368
Nitrato	AnF1A	,296	12	,005	,791	12	,007
	AnF1B	,368	12	,000	,727	12	,002

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Sistemas Biológicos FaF1A e FaF1B

#### Testes de Normalidade

Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Amônia	FaF1A	,163	12	,200*	,957	12	,735
	FaF1B	,242	12	,051	,779	12	,005
Nitrito	FaF1A	,160	12	,200*	,938	12	,473
	FaF1B	,178	12	,200*	,940	12	,501
Nitrato	FaF1A	,246	12	,043	,874	12	,073
	FaF1B	,160	12	,200*	,927	12	,345

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

## Sistemas Biológicos FaF2A e FaF2B

### Testes de Normalidade

Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Amônia	FaF2A	,187	12	,200*	,934	12	,427
	FaF2B	,155	12	,200*	,934	12	,427
Nitrito	FaF2A	,175	12	,200*	,952	12	,668
	FaF2B	,184	12	,200*	,931	12	,391
Nitrato	FaF2A	,122	12	,200*	,971	12	,922
	FaF2B	,170	12	,200*	,938	12	,476

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

## Sistemas Biológicos UaF2A e UaF2B

### Testes de Normalidade

Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Amônia	UaF2A	,246	12	,044	,906	12	,191
	UaF2B	,135	12	,200*	,963	12	,832
Nitrito	UaF2A	,165	12	,200*	,901	12	,165
	UaF2B	,154	12	,200*	,930	12	,385
Nitrato	UaF2A	,225	12	,094	,874	12	,073
	UaF2B	,252	12	,034	,850	12	,037

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

## Sistemas Biológicos ChoA e ChoB

### Testes de Normalidade

Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Amônia	ChoA	,183	12	,200*	,967	12	,874
	ChoB	,120	12	,200*	,987	12	,999
Nitrito	ChoA	,185	12	,200*	,919	12	,280
	ChoB	,171	12	,200*	,899	12	,155
Nitrato	ChoA	,141	12	,200*	,956	12	,718
	ChoB	,158	12	,200*	,969	12	,898

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Teste de Levene para testar a homogeneidade entre as variâncias dos dados entre as duplicatas A e B dos sistemas biológicos obtidos nas conversões dos íons amônia, nitrito e nitrato para a etapa 1.

### Sistemas Biológicos ParA e ParB

Teste de Homogeneidade de Variância

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	,567	1	22	,460
	Com base em mediana	,103	1	22	,751
	Com base em mediana e com df ajustado	,103	1	20,110	,751
	Com base em média aparada	,414	1	22	,527
Nitrito	Com base em média	,001	1	22	,970
	Com base em mediana	,000	1	22	,998
	Com base em mediana e com df ajustado	,000	1	21,949	,998
	Com base em média aparada	,001	1	22	,971
Nitrato	Com base em média	,046	1	22	,832
	Com base em mediana	,083	1	22	,776
	Com base em mediana e com df ajustado	,083	1	20,642	,776
	Com base em média aparada	,062	1	22	,806

### Sistemas Biológicos AnF1A e AnF1B

Teste de Homogeneidade de Variância

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	,003	1	22	,960
	Com base em mediana	,034	1	22	,856
	Com base em mediana e com df ajustado	,034	1	21,502	,856
	Com base em média aparada	,010	1	22	,922
Nitrito	Com base em média	,217	1	22	,646
	Com base em mediana	,230	1	22	,636
	Com base em mediana e com df ajustado	,230	1	21,742	,636
	Com base em média aparada	,235	1	22	,633
Nitrato	Com base em média	,044	1	22	,836
	Com base em mediana	,006	1	22	,940
	Com base em mediana e com df ajustado	,006	1	21,444	,940
	Com base em média aparada	,033	1	22	,858

## Sistemas Biológicos FaF1A e FaF1B

### Teste de Homogeneidade de Variância

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	,011	1	22	,916
	Com base em mediana	,022	1	22	,884
	Com base em mediana e com df ajustado	,022	1	18,984	,884
	Com base em média aparada	,000	1	22	,990
Nitrito	Com base em média	,023	1	22	,881
	Com base em mediana	,008	1	22	,930
	Com base em mediana e com df ajustado	,008	1	21,984	,930
	Com base em média aparada	,032	1	22	,860
Nitrato	Com base em média	,563	1	22	,461
	Com base em mediana	,471	1	22	,500
	Com base em mediana e com df ajustado	,471	1	21,999	,500
	Com base em média aparada	,507	1	22	,484

## Sistemas Biológicos FaF2A e FaF2B

### Teste de Homogeneidade de Variância

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	,002	1	22	,964
	Com base em mediana	,005	1	22	,942
	Com base em mediana e com df ajustado	,005	1	18,386	,942
	Com base em média aparada	,001	1	22	,982
Nitrito	Com base em média	,065	1	22	,802
	Com base em mediana	,044	1	22	,836
	Com base em mediana e com df ajustado	,044	1	21,997	,836
	Com base em média aparada	,061	1	22	,807
Nitrato	Com base em média	,049	1	22	,827
	Com base em mediana	,079	1	22	,782
	Com base em mediana e com df ajustado	,079	1	21,642	,782
	Com base em média aparada	,060	1	22	,810

## Sistemas Biológicos UaF2A e UaF2B

### Teste de Homogeneidade de Variância

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	,265	1	22	,612
	Com base em mediana	,504	1	22	,485
	Com base em mediana e com df ajustado	,504	1	21,566	,485
	Com base em média aparada	,291	1	22	,595
Nitrito	Com base em média	,025	1	22	,876
	Com base em mediana	,072	1	22	,791
	Com base em mediana e com df ajustado	,072	1	21,248	,791
	Com base em média aparada	,029	1	22	,865
Nitrato	Com base em média	,001	1	22	,980
	Com base em mediana	,002	1	22	,966
	Com base em mediana e com df ajustado	,002	1	21,898	,966
	Com base em média aparada	,000	1	22	,986

## Sistemas Biológicos ChoA e ChoB

### Teste de Homogeneidade de Variância

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	,217	1	22	,646
	Com base em mediana	,097	1	22	,758
	Com base em mediana e com df ajustado	,097	1	20,938	,758
	Com base em média aparada	,199	1	22	,660
Nitrito	Com base em média	,013	1	22	,912
	Com base em mediana	,012	1	22	,915
	Com base em mediana e com df ajustado	,012	1	21,959	,915
	Com base em média aparada	,013	1	22	,910
Nitrato	Com base em média	,000	1	22	,984
	Com base em mediana	,012	1	22	,915
	Com base em mediana e com df ajustado	,012	1	21,840	,915
	Com base em média aparada	,001	1	22	,978

Diferença entre médias pelo teste *t* com amostras dependentes para avaliar a igualdade estatísticas entre as duplicatas A e B dos sistemas biológicos obtidos nas conversões dos íons amônia, nitrito e nitrato para a etapa 1.

### Quanto à conversão de Amônia

Teste de amostras emparelhadas<sup>a</sup>

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior	Superior			
Par 1	ParA - ParB	-,046917	,310439	,089616	-,244160	,150327	-,524	11	,611
Par 2	AnF1A - AnF1B	-,020750	,303718	,087676	-,213723	,172223	-,237	11	,817
Par 3	FaF1A - FaF1B	-,060750	,427196	,123321	-,332177	,210677	-,493	11	,632
Par 4	FaF2A - FaF2B	,043250	,210180	,060674	-,090292	,176792	,713	11	,491
Par 5	UaF2A - UaF2B	,073917	,240765	,069503	-,079058	,226892	1,064	11	,310
Par 6	ChoA - ChoB	,001000	,145402	,041974	-,091384	,093384	,024	11	,981

a. Ions = Amônia

### Quanto à conversão de Nitrito

Teste de amostras emparelhadas<sup>a</sup>

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior	Superior			
Par 1	ParA - ParB	,000083	,015000	,004330	-,009447	,009614	,019	11	,985
Par 2	AnF1A - AnF1B	,005250	,063959	,018463	-,035388	,045888	,284	11	,781
Par 3	FaF1A - FaF1B	,007667	,055672	,016071	-,027705	,043039	,477	11	,643
Par 4	FaF2A - FaF2B	-,000250	,024853	,007174	-,016041	,015541	-,035	11	,973
Par 5	UaF2A - UaF2B	,003333	,140660	,040605	-,086038	,092704	,082	11	,936
Par 6	ChoA - ChoB	,001500	,034595	,009987	-,020481	,023481	,150	11	,883

a. Ions = Nitrito

### Quanto à conversão de Nitrato

Teste de amostras emparelhadas<sup>a</sup>

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
					Inferior	Superior			
Par 1	ParA - ParB	-,027333	,076295	,022025	-,075809	,021142	-1,241	11	,240
Par 2	AnF1A - AnF1B	-,008667	,028535	,008237	-,026797	,009464	-1,052	11	,315
Par 3	FaF1A - FaF1B	,043250	,175523	,050669	-,068272	,154772	,854	11	,412
Par 4	FaF2A - FaF2B	-,059667	,105510	,030458	-,126705	,007371	-1,959	11	,076
Par 5	UaF2A - UaF2B	-,000417	,013944	,004025	-,009277	,008443	-,104	11	,919
Par 6	ChoA - ChoB	,001500	,025033	,007226	-,014405	,017405	,208	11	,839

a. Ions = Nitrato



Teste de Wilcoxon de Postos com Sinais avaliar a igualdade estatísticas entre as duplicatas A e B dos sistemas biológicos obtidos nas conversões dos íons amônia, nitrito e nitrato para a etapa 1. Realizado para os íons e sistemas biológicos com dados não paramétricos.

### Quanto à conversão de Amônia

**Estatísticas de teste<sup>a,b</sup>**

	AnF1B - AnF1A	FaF1B - FaF1A	UaF2B - UaF2A
Z	-,392 <sup>c</sup>	-,942 <sup>c</sup>	-,314 <sup>d</sup>
Significância Sig. (2 extremidades)	,695	,346	,754
Sig exata (2 extremidades)	,718	,369	,778
Sig exata (1 extremidade)	,359	,184	,389
Probabilidade de ponto	,013	,010	,016

a. Ions = Amônia

b. Teste de Classificações Assinadas por Wilcoxon

c. Com base em postos negativos.

d. Com base em postos positivos.

### Quanto à conversão de Nitrato

**Estatísticas de teste<sup>a,b</sup>**

	AnF1B - AnF1A	FaF1B - FaF1A	UaF2B - UaF2A
Z	-,830 <sup>c</sup>	-,663 <sup>d</sup>	-,060 <sup>c</sup>
Significância Sig. (2 extremidades)	,407	,507	,952
Sig exata (2 extremidades)	,441	,545	1,000
Sig exata (1 extremidade)	,221	,272	,500
Probabilidade de ponto	,016	,020	,047

a. Ions = Nitrato

b. Teste de Classificações Assinadas por Wilcoxon

c. Com base em postos negativos.

d. Com base em postos positivos.

### APENDICE III

Análise de PCR e avaliação do sucesso de extração de DNA e das ampliações em eletroforeses em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os sistemas biológicos após 120 de operação visando o enriquecimento dos micro-organismos anammox.

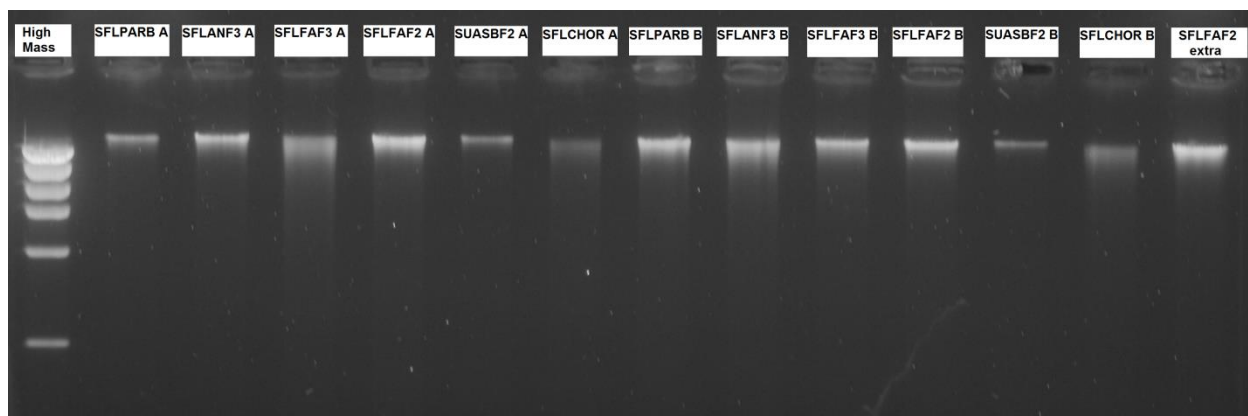


Figura III.1: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para avaliação do DNA genômico extraído das biomassas dos sistemas biológicos após 120 dias para enriquecimento anammox. **SFLPARB**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF (Par A e B); **SFLANF3**: lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 3, Araguari/MG (AnF1 A e B); **SFLFAF3**: lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 3, Araguari/MG (FaF1 A e B); **SFLFAF2**: lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG (FaF2 Ae B); **SUASBF2**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG (UaF2 Ae B); **SFLCHOR**: lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília/DF (Cho A e B). (A e B se referem aos sistemas em duplicatas).

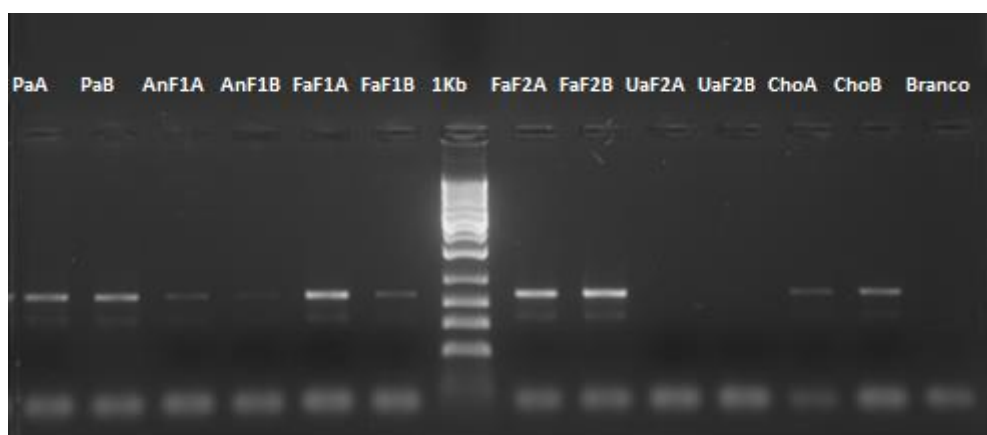


Figura III.2: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para avaliação de fragmentos amplificados de 774 pb, dos seis inóculos após 120 dias para enriquecimento anammox nas culturas bateladas com os pares de primers Pla 46F e Amx 820R. **Par**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1**: lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1**: lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2**: lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **Cho**: lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília/DF. (A e B refere-se aos sistemas em duplicatas).

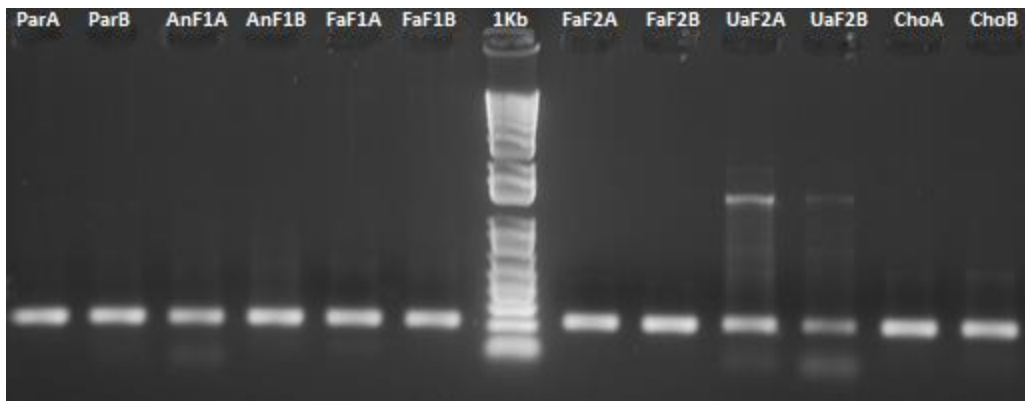
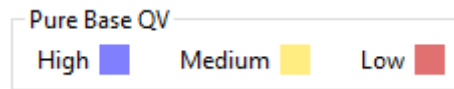


Figura III.3: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para avaliação de fragmentos amplificados de 225 pb, a partir dos inóculos testados nos experimentos em bateladas para enriquecimento anammox, com os pares de *primers* Nitro 1198Fe Nitro 1423R para micro-organismos como *Nitrobacter*. **Legenda:** **Par**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1**: lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1**: lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2**: lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **CHOR**: sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF.

## APENDICE IV

Avaliação da qualidade das sequências dos fragmentos de DNA para o RNAr 16S obtidas pela análise do sequenciamento realizado pela Macrogen (Seul, Coréia do Sul), contratando-se o serviço EZseq, utilizando o software Sequence Scanner.

Sendo a qualidade dos sinal dos picos para cada base nitrogenada: cinza: duvidoso; amarelo: bom ; vermelho: ruim ; azul: excelente



Sequência obtida a partir da biomassa do sedimento do Paranoá (Pa inicial) – *Primer* Pla46F – **selecionada para comparações filogenéticas**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\PAinF\_13DBZAC\_004\_PLA46F.ab1

1	GGGGGGCTCG	CAGAGACAGA	GATAAGTGGC	GGAAGGGCGA	GTAATGCATA	GATAACCTAC	CCCCGAGATG	GGAATAAGCA	TTCGAAAGGA	TAGCTAATAC	CCAAATGAGAC	CACGGATCGC	120
121	ATGATCTGTG	CTTAAAGATG	GGGACCCGCA	AGGGCCCTTC	GCTCGGGGAG	GGGTTTATGT	CCTATCAGCT	AGTTGGTGAG	GTAAAGGCC	ACCAAGGCTA	TGACGGGTAG	CCGACCTGAG	240
241	AGGGTGACCG	GCCGCACTGG	GACTGAGACA	CTGCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCTGCAGTC	GAGGATCTTC	CGCAATGCGC	GAAAGCGTGA	CGGAGCGACG	CCGCGTGGGT	GATGAAGGCC	360
361	TTCCGGTTGT	AAAGCCCTGT	CACCTGGGAA	GAATGGCGGG	AGGTGAATAG	CCATCTCGTC	TGACGCTACC	AGGAAGGAA	GCACCCGCTA	AATACGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATACGTA	480
481	TGGTGCAGAC	GTTGTTCCGA	ATCACTGGGC	ATAAAGAGCA	CGTAGGCGGT	TGAGCAAGTC	CATTGTGAA	TCCCCGGCT	TAACCGGGGA	ACTGCAGTGG	ATACTACTTG	ACTTGAGTGC	600
601	AGGAGGGGA	AGTGGAATTC	CAGGTGGAGC	GGTGAATGC	GTAGATATCT	GGAGGAACGC	CGGTGGCGAA	AGCGACTCTC	TGGTCTGTAA	CTGACGCTGA	GGTGCGAAAG	CTAGGGGAGC	720
721	AAACGGGATT	AGATACCCCG	GTAGTCCTAG	CCCTAACGAT	GGCTAGAAAG	GGGGGTTTIT	TTTTAAAAA	GGG					793

Sequência obtida a partir da biomassa do sedimento do Paranoá (Pa inicial) – *Primer* Amx820R – **utilizada para complementação da sequência obtida com o primer Pla46F.**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\PAinR\_13DBZAC\_014\_Amx820R.ab1

1	AAAAATCTTA	GCAGGACACC	GAGGGTATCT	AATCCCGTTT	GCTCCCCTAG	CTTTCGCACC	TCAGCGTCAG	TACAGACCA	GAGAGTCGCT	TTCCGCCCGG	BCGTTCTCTC	TGATATCTAC	120
121	GCATTTACCC	GCTCCACCAG	GAATTCCTACT	CTCCCCTCCT	GCACCTCAAGT	CAAGTAGTAT	CCACTGCAGT	TCCCAGGTTA	AGCCGGGGGA	TTTCACAATG	GACTTGCTCA	ACCGCCTACG	240
241	TGCTCTTTAT	GCCCAGTGAT	TCCGAACAAC	GTTCCGACCA	TACGTATTAC	CGCGGGTCTG	GGCAGTATT	TAGCCGGTGC	TTCTCTCTCT	GGTAGCGTCA	AACGAGATGG	CTATTCACCT	360
361	CCCGCCATTC	TTCCAGGTG	ACAGGGCTTT	ACAACCCGAA	GGCTTTCATC	ACCCACGCGG	CGTCGCTCCG	TCACGCTTTC	GCGCATTGCG	GAAGATCCTC	GACTGCAGCC	TCCCGTAGGA	480
481	GTCTGGGCAG	IGTCTCAGTC	CCAGTGCGGC	CGGTCAACCT	CTCAGGTCGG	CTACCCGTC	TAACTTGGT	GAGCGTTTAC	CTCCCCACT	AGCTGATAGG	ACATAAACCC	CTCTCCGAGC	600
601	GAAAGCCCG	TGCGGATCCC	TTTTTTTAAAT	CTCTAATCAI	GTTACTCATG	ATCTAATTAG	GTATTACTTA	CCCTTTTCAA	TAGTTTTTCC	CATTTCSAAG	GTAGTAATCT	ATGCATTACA	720
721	CGTCTTAAT	ATACCTGATT	GATTTCTCTGA	AAATCTTTT	TCTATTAGIT	GGTTTTCTAA	TATAATTTTA	TTA					793

Sequencia obtida a partir da biomassa do sistema biológico com sedimento do Paranoá (PaA) – *Primer* Pla46F – **não selecionada**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\PAenF\_13DBZAC\_009\_PLA46F.ab1

1	ACCGGGATGG	CTACGTGATG	TGATTTTGG	GACGAGGGGA	GTGATGCGTA	TCTAACCTAC	CCTTGGTACA	GGGATAACCA	GGAGAAATCT	TGGATAATAC	ACGATAGGCT	CGCGGGTTG	120
121	CATGGCCCTG	CGAGTAAAGA	AGGCCTCTTA	GCACTGCTTT	CGACCGAGGA	CAGGACTATG	TCCTATCACC	TATTTGGTAG	GGTAATGGCC	TACCAAGGCG	ATGACGGTA	GCCGACCTGA	240
241	TAGGGTGACC	GGCCACACTG	GGACTGAGAC	ACTGCCACA	CTCCTACGGG	AGGCTGCAGT	CGAGAATCTT	CCGCAATGGG	GGAAACCCTG	ACGGAGCGAC	GCCGCGTGCG	GGATGAAGGC	360
361	CTTCGGSTTG	TAAACCGCTG	TCACGCATTA	TGAAGGGTCC	GGCGTTAACA	GCCTGGGCTI	TTGACGAAGG	TGCGGGAGGA	AGCCACGGCT	AACTCTGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAAGACAG	480
481	AGGTGGCGAC	CGTTGTTCCG	AATCACTGGG	CATAAAGCGC	GCGTAGGCGG	CATGGTAAGT	CGGGTGTGAA	ATCCCTCGGC	CCAACCGAGG	AAATCGCTCG	AAACTACCCT	GCTTGAGGAC	600
601	AGGAGGGGAG	CCTGGAATTC	CTGTTGGAGC	GTTGAAATGC	GTTGATATCA	GGAGGAACAC	CGCGCGCGAA	GGCGAGGCTC	TGGTCTGTTI	CTGACGCTGA	GGCGGAAAG	CTAGGGGAGC	720
721	AAACGGGATT	AGATACCCCG	GTAGTCTTAC	CCGTAAACGA	TGGGCACTAA	GAAAGGGGGG	TTTTTTTAAA	AAAACCGGGG	GGGG				804

Sequencia obtida a partir da biomassa do sistema biológico com sedimento do Paranoá (PaB) – *Primer* Amx820 R – **selecionada para comparações filogenéticas.**

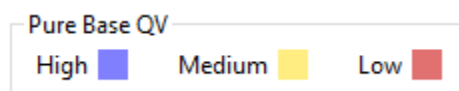
C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\PaBenR\_13DBZAC\_017\_Amx820R.ab1

1	AAAAATCCAG	TTGGTATACT	GATCCTACT	AATCCCGTTI	GCTCCCTTAG	CTTTCGCACC	TCAGCGTCAG	AAACAGACCA	GAGCCTCGCC	TTCCGCCCGG	GTGTTCTCTC	TGATATCAAC	120
121	GCATTTCCAC	GCTCCACCGG	GAATTCACGG	CTCCCTCCG	GTCCTCAAGC	ACGGTAGTTT	CGAGCGCAAT	TCCTCGGTTG	GGCCGAGGGA	TTTACACCC	GACTTACCAT	GCCGCTIACG	240
241	CGCGCTTTAT	GCCCGATGAT	TCCGAACAAC	GGTCGCCACC	TCTGTCTTAC	CGCGGCTGCT	GGCACGAAGT	TAGCCGTGGC	TTCCCTCCCG	ACCTTCTGCA	AAACCCAACG	CTGTAAACGC	360
361	CCGACCCCTT	TTAATGCGTG	ACAGCGGTTI	ACAACCCGAA	GGGCTTCATC	CCGCACCGGG	CGTCCGCTCG	GCAGGGTTTC	CCCCATTGGG	GAAAGAACTC	GACTGGAGCC	TCCGTAAGA	480
481	ATCTGGGCAG	TGTCTCAGTC	CCAGTGTGGC	CGGCACCCTC	TCAGGGCCGG	TACCCGTCAI	TCCCTTGGTA	GSCATTACCC	TACCAACTAG	CTGATAGGAC	ATAGTCCCGT	CCTCGGACGA	600
601	AAGCATTGCT	AAGAGGCCTT	CTTTTATCGC	AGGGCCATGC	AACCCCGCGA	GCCTATCTGG	TATTAGCCAA	GATTICTCCT	GGTATACCCC	GTACCAAGGG	GAGGTTAGCT	ATGCATTACT	720
721	CACCCGTTCC	CCACTTTCAC	CTCACCGAAG	CGAGGATCAC	GTACGACTTG	ATGGCTAAAT	TCAAAAAGAG	GCT					793

Sequencia obtida a partir da biomassa do lodo da lagoa anaeróbia do frigorífico 1, Araguari /MG (AnF1 inicial) – *Primer* Pla46F – **selecionada para comparações filogenéticas.**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\ANinF\_13DBZAC\_005\_PLA46F.ab1

1	GGGGGATGG	CAGAGACAGA	GATTATAGGC	GGTAGGGCGA	STAATGCATA	GATAACCTAC	CTCCAAGATG	GGAAATAACCA	TTCGAAAGGA	TGGCTAATAC	CCAATGAGAC	CACGAGTCGA	120
121	ATGGCTTGTG	CTTAAAGATG	GGGACCCGCA	AGGGCCTTTC	GCTCGGAGAG	GGGTTTATGT	CCTATCAGCT	TGTTGGTGAG	GTAACGGCCC	ACCAAGGCTT	TGACGGGTAG	CCGACCTGAG	240
241	AGGGTGACCG	GCCGCACTGG	GACTGAGACA	CTGCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCTGCAGTC	GAGGATCTTC	CGCAATGCGC	GAAAGCGTGA	CGGAGCGAGC	CCGCGTGGGT	GATGAAGGCC	360
361	TTCGGTTTGT	AAAGCCCTGT	CGCCTGGGAA	GAATGGCGGG	AGGTGAATRA	CCATCTCGCT	TGACGCTACC	AGGGGAGGAA	GCACCGGCTA	AAATAGTGCC	AGCAGCCGG	STAATACGTA	480
481	TGGTGCGAAC	GTTGTTCCGA	ATCACTGGGC	ATAAAGAGCA	CGTAGGCGGT	TGAGCAAGTC	CAITGTGAAA	TCCCCGGCT	TAACCGGGGA	AGTGCAGTGG	ATACTACTTG	ACTTGAGTGC	600
601	AGGAGGGGAG	AGTGGAAATC	CTGGTGGAGC	GGTGAATGC	GTAGATATCA	GGAGGAACGC	CGGTGGCGAA	AGCGACTCTC	TGGTCTGTAA	CTGACGCTGA	GGTGCGAAAG	CTAGGGGAGC	720
721	AAACGGGATT	AGATACCCCG	GTAGTCTTAC	CCGTAAACGA	TGGGCACTAA	TAAAGGGGGG	TTTAAAGGG	A					791



Sequencia obtida a partir da biomassa do lodo da lagoa anaeróbia do frigorífico 1, Araguari /MG (AnF1 inicial) – *Primer Amx R* – **não selecionada**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\AnInR\_13DBZAC\_015\_Amx820R.ab1

1	GGGGGGGAGG	AATGGGCAGG	ACAGCTGAGC	GATCTAATC	CCGTTTGCTC	CCCTAGCITT	CGCACCTCAG	CGTCAGTTAC	AGACAAGAGA	GTCGGTTTGG	CCACCGCGGT	TCCTCCTGAT	ATCTACGCAT	130
131	TTCAACGCTC	CACCAGGAAT	TCACACTCTCC	CCTCCTGCAC	TCAAGTCAAAG	TAGTATCCAC	TGCACCTCCC	CGGTTICAG						208

Sequencia obtida a partir da biomassa dos sistemas biológicos com lodo da lagoa anaeróbia do frigorífico 1, Araguari/MG (AnF1B) – *Primer Pla46 F* – **selecionada para comparações filogenéticas.**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\AnBenF\_13DBZAC\_012\_PLA46F.ab1

1	GAAAGGCTGG	CATGGTAGAG	TGATGTGGC	TACGGGTGAG	TAATGCATAG	CTAACCTACC	CTTGGTACGG	GGATAACCAG	GAGAAATCTI	GGCTAATACC	CGATAGGCTC	GCGGGGTTGC	120
121	ATGCCCCTGC	GATTAAAGAA	GGCCTCTTAG	CAATGCTTTC	GACCGAGGAC	GGGACTATGT	CGTATCAGCT	AGTTGGTAGG	GTAATGGCCTI	ACCAAGGCAA	TGACGGGTAG	CCGACCTCAG	240
241	AGGGTGACCC	GCCCCCTGG	GACTGACACA	CTGCCACAC	TCCTACCGBA	GGCTGCCGGC	GAAAACTTTC	CGCCATGGGG	GAAACCTGA	CGGAGCCACC	CCGCGCGCGG	GATGAACGCC	360
361	TTCCGGCTCT	AAACCGCTGT	CAGCATTAA	GAAAGGTCGG	CGTAAACAG	CGTGGGCTI	TGACGAACGT	GCCGAGGAA	GCCACGGCTA	ACTCTGTGCC	AGCAGCCGCC	GTCAGACAGA	480
481	CGTGGCGACC	GTTGGTCGGA	ATCACTGGGC	ATTGAGCGCG	CGTACGCGGC	CTGGTAAGTC	GGGTGTGAAA	TCCCTCCGCC	CACCGACGA	ATTGQCCTCG	AAACTACCGT	GCTTGAGGAC	600
601	AGCAGGGAGC	CTGGAATTC	TCGTGGAGCG	GCGAAATGCG	TGATATCAT	GAAGAACACC	GGCGGCGAAG	GCGAGGCTCT	GCTCTGCTTC	TGACGCTGAG	GCGCGAAACT	ACGGGAGAAA	720
721	CGGGATAGAT	ACCCCGGAGT	CCTACCGCAA	CCATGGCACT	AGTAGAGGGG	TTTAACTTCT	GTTCTGTTAG	ATCAATTATTA	TGAGACTTCT	AGCAATTTGC	CATCTAGACA	AGAGTAGCGC	840
841	CGCGGCTCT												849

Sequencia obtida a partir da biomassa do lodo da lagoa facultativa do frigorífico 1, Araguari/MG (FaF2 inicial) – *Primer Pla46 F* – **selecionada para comparações filogenéticas.**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\F3inF\_13DBZAC\_006\_PLA46F.ab1

1	GAGGGGATGG	CTAGGTGAGG	GGTTTTAGG	CGGTAGGGCG	AGTAATGCAT	AGATAACCTA	CCTCAGAGAT	GGGAAATAAC	ATTCGAAAGG	ATGGCTAATA	CCCAATGAGA	CCACGAGGCG	120
121	AATGGCTTGT	GCTTAAAGAT	GGGGACCCGC	AAGGGCCITT	CGCTCGGAGA	GGGGTTTATG	TCCATATCAGC	TGTGTTGGTGA	GGTAACGGCC	CACCAAGGCT	TTGACGGGTA	GCCGACCTGA	240
241	GAGGGTGACC	GGCCGCACTG	GGACTGAAAC	ACTGCCAAA	CTCCTACGGG	AGGCTGCAGT	CGAGGATCTT	CGGCAATGCG	CGAAAGCGTG	ACGGAGCGAC	GCCGCGTGGG	TGATGAAGGC	360
361	CTTCGGGTTG	TAAAGCCCTG	TCGCCTGGGA	AGAAATGGCGG	GAGGTGAATA	ACCACTCTGC	TTGACGCTAC	CAGGGGAGGA	AGCACCGGCT	AAATACGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAATACGT	480
481	ATGGTTCGAA	CGTTGTTCGG	AATCACTGGG	CATAAAGAGC	ACGTAGGCGG	TGAGCAAGT	CCATTGTGAA	ATCCCCGGGC	TTAACGGGGG	AAGTGCAGTG	GATACTACTT	GACTTGAGTG	600
601	CAGGAGGGGA	GAGTGAATT	CCTGGTGGAG	CGGTGAATG	CGTAGATATC	AGGAGGAACG	CCGGTGGCGA	AAGCGACTCT	CTGGTCTGTA	ACTGACGCTG	AGGTGCGAAA	GCTAGGGGAG	720
721	CAAACGGGAT	TAGATACCCC	GGTAGTCCTA	GCCCTAAACG	ATGGGCACTA	GTAAGGGGT	TTTTAAATG						790



Sequencia obtida a partir da biomassa do lodo da lagoa facultativa do frigorífico 2, Uberlândia/MG (FaF2 inicial) – *Primer Pla46 F* – **não selecionada**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOUTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENÉTICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\F2inF\_13DBZAC\_007\_PLA46F.ab1

1	GAGGAGATTC	CAAAGACAGA	GTACAGTGGC	GGATGGGCGA	GTAATGCATA	TATAACCTAC	CTCCTTTATG	GGAAATACCA	TTCGAACTGA	TGGCTAATAC	CCAATGAGAC	CACTAGTCCA	120
121	ATGGCITGTG	CTTAAAGATG	GGCACCOCGA	AGGGCCTTTC	GCTCGGAGAG	GGGTTTTTGT	CTCTCTCCTT	GCTGGTGACG	TCTCCTCTTC	CCCACGCGAC	ACCGGGTGCC	TATCGCTCTC	240
241	ACTCCTATCC	CTCCCCGTAC	ACGACATTTT	CCCACCACCT	TAGCGCTGCT	CCCCCACACT	ACTCACCTCA	TAGACACTCG	TCTCATACCA	TACCTCTTCC	CCCCTCCATA	AGCGATTATA	360
361	ACTCCACIG	ATGCTCTGTT	CCCCAAAAAA	CATAACCGIG	GTATCACACA	AAATACTTCT	CTTCATTTTA	CGACGCACTC	TCTAAAAGAGC	ATACTACTTC	CTGGTCTTCT	CCCTCTTAC	480
481	TGCGCACTAG	GGGAAATTC	TCAGTATCTT	CTCCTCCGCC	GCTTGTGAG	AGTCTTTATT	TGAGCCAGTC	CCCCACCTG	ATATGTGCTC	ACAAAAGAAAT	CAGTCGTAC	GACGGCTATA	600
601	TATAGCATCT	TTTTTTCATT	CACAATGAAC	GTGGCTGGCA	TCTACAAAAA	AATTCATCCT	CTTACTGAAG	GACAATATAT	CTAACACATT	CCATCCATCC	CCCATCCAAA	GAAAAAATAA	720
721	AACATATTTT	ACCCCGAGTC	CAACCACCTC	CACCTTCACC	CTCCATCCAT	TAACTTAAAC	TAATATAATA	TAAATTAAC	GCCACGGGTA	CCGTGACCTT	CAACACCCGG	TGGCGTTTTT	840
841	TCCGAATAGC	AAAACCCGGG	TGGGGGAGTT	TACAATACTT	TGAAGAATCA	CTAGACTCCG	GATTCTCTCC	ATTCTCTTTC	TCCTTTTCCC	TGTTGCACCT	TAATTCACC	TGGCAATGTC	960
961	TAAAAACCCA	ATAGATCCAA	ACTTTTAAAA	ATTTTTTTTG									1000

Sequencia obtida a partir da biomassa do lodo da lagoa facultativa do frigorífico 2, Uberlândia/MG (FaF2 inicial) – *Primer Amx820 R* – **selecionada para comparações filogenéticas.**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOUTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENÉTICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\F2inR\_13DBZAC\_016\_Amx820R.ab1

1	CAAAAAAAG	AAAAAGGAGG	ACACAAACGA	CATCTAATCG	CAGGTGCTC	CCCTAGCTAC	AGCACCCAC	CCGGAAGCCA	AAGACTATAA	AGTCTCTTTC	GGCGCGGGC	TTCTTCTGA	120
121	TATCTACGCA	TTTCACCGCT	CCAACAGGAA	TTCACCTCTC	CCCTCCTGCA	CTCAAGTCAA	GTAAGTATCCA	CTGCACCTTC	CCGGTTAGC	CGGAGSATTT	CACAATGGAC	TTGGTCGACC	240
241	GCCTACGTGC	TCTTTATGCC	CAGTGATTCC	GAACAACGCT	CGCACATAC	GTATTACCGC	GGCTGCTGGC	ACGTATTAG	CCGGTTGCTT	CCTCCCCTGC	TAACTGCAA	CGAGATGATT	360
361	ATTCACTCC	CGCCATTCTT	CCCAGGCGAC	AGGGCTTTAC	AACCCGAAAG	CCTTCATCAC	CCACGCGGCG	TCGCTCCGTC	ACGCTTTCGC	GCATTGCGGA	AGATCCTCGA	CTGCAGCCTC	480
481	CCGTAGGAGT	CTGGGCAGTG	TCICAGTCCC	AGAGCGGCGG	GTCAACCTCI	CAGGGCGGCT	ACCCGTCAAA	GCCTTGTGG	GCCGTTACCT	CACCAACAAG	CTGATAGGAC	ATAAACCCCT	600
601	CTCCGAGCGA	AAGGCCCTTG	CGGGTCQCCA	TCTTTAAGCA	CAAAACCAITC	GACTCGTGGG	CTCAITGGGT	ATTAGCCATC	CITTCGAATG	GTTATTCCCA	TCTTGGAGGI	AGGTTATCTA	720
721	TGCATTACTC	GCCCTTCCGC	CACCTTACTC	GTCTCTTGA	GAACTTTCTI	CGCCGACTTG	ATGCCTAATC	CATCGAGTTC	CAGGCACACC	CAGCCCTACG	CGGGCCTTAA	AAAAAACAAA	840
841	AAAAAAAATG	AAATAAGAAA	AAGAAGAAA	AAAAATAAGA	AG								882

Sequencia obtida a partir da biomassa do sistema biológico com lodo da lagoa facultativa do frigorífico 2, Uberlândia/MG (FaF2A) – *Primer Pla 46F* – **selecionada para comparações filogenéticas.**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOUTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENÉTICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\F2AenF\_13DBZAC\_011\_PLA46F.ab1

1	GAAGGATGGC	TAGGTAGAGT	GAATTIAGCG	ACGGGTGAGT	AATGCATAGC	TAACCTACCC	TTGGTACGGG	GATAACCAGG	AGAAATCTTG	GCTAATACCC	GATAGGCTCG	CGGGTTGCA	120
121	TGGCCCTGCG	ATTAAGAAG	GCCTCTTAGC	AATGCTTTCC	ACCGAGGACG	GGACTATGTC	CTATCAGCTA	GTTGGTAGGG	TAATGGCCTA	CCAAGGCAAT	GACGGGTAGC	CGACCTGAGA	240
241	GGGTGACCGG	CCCACTGGG	ACTGAGACAC	TGCCAGACT	CCTACGGGAG	GCTGCAGTCG	AGAATCTTCC	GCAATGGGGG	AAACCCTGAC	GGAGCGACGC	CGCGTGCGGG	ATGAAGCCTT	360
361	TCGGGTTGTA	AACCGCTGTC	ACGCATTAAG	AAGGGTCCGG	CGTTAACAGC	GCTGGGCTTT	GACGAAGGTG	CGGGAGGAA	CCACGGCTAA	CTCTGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAAGACAGAG	480
481	GTGGCGACCG	TTGTTGGA	TCACTGGGCA	TAAAGCGCGC	GTAGGCGGCA	TGGTAAGTCG	GGTGTGAAAT	CCCTCGGCC	AACCGAGGAA	TGCGCTCGA	AACTACCGTG	CTTGAGGACA	600
601	GGAGGGGAGC	CTGGAATCC	TGGTGGAGCG	GTGAAATGCG	TTGATATCAG	GAGGAACACC	GGCGGCGAAG	GCGAGGCTCT	GGTCTGTTTC	TGACGCTGAG	GCGCGAAAGC	TAGGGGAGCA	720
721	AACGGGATTA	GATACCCGG	TAGTCTTAGC	CGTAAACGAT	GGGCAC TAGA	AAGGGGGGGT	TATATAAAGG	GGAG					794

Sequencia obtida a partir da biomassa do sistema biológico com lodo da lagoa facultativa do frigorífico 2, Uberlândia/MG (FaF2A) – *Primer* Amx820R – **não selecionada**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\F2AenR\_13DBZAC\_018\_Amx820R.ab1

1	AAAAAAACCA	CTAAAAAGGC	GAAATCACTC	AACTCTTTTT	AGTTTCGCC	TTGAGCACAC	ACTCTCCC	GAGAACAATA	GATTTGATTT	CTCACAGGCG	GCGGAGAGTC	GTTATATCAC	GACATCTCAC	130
131	GAGCCCTCCT	CGTGTTCAT	GTTGGGCTCA	CAGACCACGC	GTGTGTCCGG	TTTCTCTCC	CCCCCTCTCT	TTTTTCGTTN						210

Sequencia obtida a partir da biomassa do sistema biológico com lodo da lagoa facultativa do frigorífico 2, Uberlândia/MG (FaF2B) – *Primer* Pla 46F – **selecionada para comparações filogenéticas.**

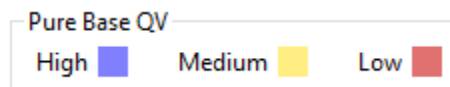
C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\F2BenF\_13DBZAC\_010\_PLA46F.ab1

1	GGAAAAATGG	CTAGTTGAGG	GGTTTTAGCG	ACTAGGTGAG	TAAATGCATAG	CTAACCTAC	CTTGGTACGG	GGATAACCG	GTAGAAATCT	TGGCTAATAC	CCGATAGGCT	CGCGGGGTTG	120
121	CATGGCCCTG	CGATTAAAGA	AGGCCTCTTA	GCAATGCTTT	CGACCGAGGA	CGGACTATG	TCCTATCAGC	TAGTTGGTAG	GGTAATGGCC	TACCAAGGCA	ATGACGGGTA	GCCGACCTGA	240
241	GAGGGTGACC	GGCCACACTG	GGACTGAGAC	ACTGCCAGAG	CTCCTACGGG	AGGCTGCAGT	CGAGAATCTT	CCGCAATGGG	GGAAACCCTG	ACGGAGCGAC	GCCGCGTGGC	GGATGAAGGC	360
361	CTTCGGGTTG	TAAACCGCTG	TCACGCATTA	AGAAGGGTCC	GGCGTTAACA	GCGCTGGGCT	TTGACGAAGG	TGCGGGAGGA	AGCCACGGCT	AACTCTGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAAGACAG	480
481	AGGTGGCGAC	CGTTGTTCCG	AATCACTGGG	CATAAAGCGC	GCGTAGGCGG	CATGGTAAGT	CGGGTGTGAA	ATCCCTCGGC	CCAACCGAGG	AAATGCGCTC	GAAACTACCG	TGCTTGAGGA	600
601	CAGGAGGGGA	GCCTGGAATT	CCTGGTGGAG	CGGTGAAATG	CGTTGATATC	AGGAGGAACA	CCGGCCGCGA	AGGCGAGGCT	CTGGTCTGTT	TCTGACGCTG	AGGCGCGAAA	GCTAGGGGAG	720
721	CBAACGGGAT	TAGATACCCC	GGTAGTCTTA	GCCGTAAACG	ATGGGCACTA	AAAAGGGGG	GTTTAAAAA	AGGAABAAGG	AGCCCCGGAA	AA			812

Sequencia obtida a partir da biomassa do sistema biológico com lodo da lagoa facultativa do frigorífico 2, Uberlândia/MG (FaF2B) – *Primer* Amx820R – **selecionada para comparações filogenéticas.**

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\F2BenR\_13DBZAC\_019\_Amx820R.ab1

1	AACATTCACC	TGACTAGTCT	AGTCATACT	AATCAGGTTT	GCTCCCCTAG	CTTTCGGCC	TCAGCGTCAG	AAACAGACCA	GAGCCTCGCC	TTCCGCGCG	GTGTTCTCTC	TGATATCAAC	120
121	GCATTCACC	GCTCCACCAG	GAATTCACAG	CTCCCCTCCT	GTCTCAAGC	ACGGTAGTTT	CGAGCGCAAT	TCCTCGGTTG	GGCCGAGGGA	TTTCACACCC	GACTTACCAT	GCCGCCTACG	240
241	CGCGCTTTAT	GCCCACTGAT	TCCGAACAAC	GGTCGCCACC	TCTGTCTTAC	CGCGGTGCT	GGCAGAGAGT	TAGCCGTGGC	TTCTCTCCGC	ACCTTCGTCA	AAGCCCAGCG	CTGTAAACGC	360
361	CGGACCTTC	TAAATGCGTG	ACAGCGGTTT	ACAACCCGAA	GGCCTTCATC	CCGCAGCGGG	CGTCGCTCCG	TCAGGGTTTC	CCCCATGCG	GAAGATTCTC	GACTGCAGCC	TCCCGTAGGA	480
481	GTCTGGGAC	TGTCTCAGTC	CCAGTGTGGC	CGTCCACCT	CTCAGGTCGG	CTACCCGTC	TTGCCTTGGT	AGGCCATTAC	CCTACCAACT	AGCTGATAGG	ACATAGTCCC	GTCTCGGTC	600
601	GAAAGCATTG	CTAAGAGGCC	TTCTTTAATC	GCAGGGCCAT	GCAACCCGCG	GAGCCTATCG	GGTATTAGCC	AAGATTCTC	CTGGTTATCC	CCGTACCAAG	GGTAGGTTAG	CTATGCATTA	720
721	CTCACCCGTT	CGCCACTTTC	ACCTCACCGA	AGCGAGGATC	ACGTACGACT	TGAGGCCCTA	AATCCAAAAA	AAAAATTTTT	GGTTTTTTTT	A			811





Sequencia obtida a partir da biomassa do lodo do Uasb frigorífico 2, Uberlândia/MG (UaF2 inicial) – *Primer* Pla46F – **não selecionada**.

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\UAinF\_13DBZAC\_008\_PLA46F.ab1

1	GGGGGCAAAG	ATGGCTAGTG	AGGGGTTTIG	GGGTTTTATG	GAGGGTATTT	TAAGNACGCC	CCCCCCCAG	AAGGAAATAC	CCGTTATACG	CGATGGATTA	CACCCTATGA	TACCCGCGAC	TAAATGGCG	130
131	TGCGCTTAAA	GATGGGGACC	CGCAGGGCCC	GTTCCCTCGA	AAACGGGCTG	CTGCCCTATC	ACCTTGTGG	T						201

Sequencia obtida a partir da biomassa do sistema biológico com sedimento da lagoa de chorume, Brasília/DF (ChoA) – *Primer* Pla 46F – **selecionada para comparações filogenéticas**.

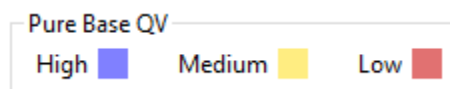
C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\ChoAF\_13DBZAC\_013\_PLA46F.ab1

1	GGAGGGATGC	ATCAGTAGAG	TGGATTGAG	CGACGGTGA	GTAATGCATA	GCTAACCTAC	CCTTGGTACG	GGGATAACCA	GGAGAAATCT	TGGCTAATAC	CCGATAGGCT	CGCGGGTTG	120
121	CATGGCCCTG	CGATTAAAGA	AGGCCTCTTA	GCAATGCTTT	CGACCGAGGA	CGGGACTATG	TCCTATCAGC	TAGTTGGTAG	GGTAATGGCC	TACCAAGGCA	ATGACGGGTA	GCCGACCTGA	240
241	GAGGGTGACC	GGCCACACTG	GGACTGAGAC	ACTGCCCAGA	CTCCTACGGG	AGGCTGCAGT	CGAGAATCTT	CCGCAATGGG	GGAAACCCTG	ACGGAGCGAC	GCCGCGTCCG	GGATGAAGGC	360
361	CTTCGGGTTG	TAAACCGCTG	TCACGCATTA	AGAAGGGTCC	GGCGTTAACA	GCGCTGGGCT	TTGACGAAGG	TGCGGGAGGA	AGCCACGGCT	AACTCTGTGC	CAGCAGCCGC	GGTAAGACAG	480
481	AGGTGGCGAC	CGTTGTTCCG	AATCACTGGG	CATAAAGCGC	GCGTAGGCGG	CATGGTAAGT	CGGGTGTGAA	ATCCCTCGGC	CCAACCGAGG	AATTGCGCTC	GAAACTACCG	TGCTTGAGGA	600
601	CAGGAGGGGA	GCCTGGAATT	CCTGGTGGAG	CGGTGAAATG	CGTTGATATC	AGGAGGAACA	CCGGCGCGCA	AGGCGAGGCT	CTGGTCTGTT	TCTGACGCTG	AGGCAGGAAA	GCTAGGGGAG	720
721	CAAACGGGAT	TAGATACCCC	GGTAGTCTTA	GCCGTAACCG	ATGGGCATAAT	AAAGGGGGGG	TTTTAAAAGG	GGGG					794

Sequencia obtida a partir da biomassa do sistema biológico com sedimento da lagoa de chorume, Brasília/DF (ChoA) – *Primer* Amx 820R – **selecionada para comparações filogenéticas**.

C:\Users\GenildaMaria\Documents\Samsung\DOCTORADO 2014\COMPARAÇÕES FILOGENETICAS SEQUENCIAMENTO MARÇO 2014\Resultados Korea\Genilda\ChoAenR\_13DBZAC\_020\_Amx820R.ab1

1	AGGCACTCAG	AGTTAGTAAC	TAGGGATACT	AATCCCGTTT	GCTCCCCTAG	CTTTCGCGCC	TCAGCGTCAG	AAACAGACAA	GAGCCTCGCC	TTGCGCGCCG	GTGTTCTCC	TGATATCAAC	120
121	GCAITTCACC	GCTCCACGAG	GAATTCAGG	CTCCCTCCT	GTCTCAAGC	ACGGTAGTTT	CGAGCGCAAT	TCCTCGGTTG	GGCCGAGGGA	TTTCACACCC	GACTTACCAT	GCCGCCTACG	240
241	CGCGCTTAT	GCCAGTGAT	TCCGAACAAC	GGTCGCCACC	TCTGTCTTAC	CGCGGCTGCT	GGCACAGAGT	TAGCCGTGGC	TTCTCTCCGC	ACCTTCGTCA	AAGCCCAGCG	CTGTTAACGC	360
361	CGGACCCITC	TTAATGCGTG	ACAGCGGTTT	ACAACCCGAA	GGCCTTCATC	CCGCACGCGG	CGTCGCTCCG	TCAGGGTTTC	CCCCAATGCG	GAAGATTCTC	GACTGCAGCC	TCCCGTAGGA	480
481	GTCTGGGCAG	TGCTCAGTC	CCAGTGTGGC	CGGTCAACCT	CTCAGGTCGG	CTACCCGTC	TTGCCTTGAT	AGGCCAATAC	CCTACCAACT	AGCTGATAGG	ACATAGTCCC	GTCCCTCGTTC	600
601	GAAAGCAITG	CTAAGAGGCC	TTCTTTAATC	GCAGGGCCAT	GCAACCCCGC	GAGCCTATCG	GGTATTAGSC	AAGATTCTC	CTGGTTATCC	CCGTACCATG	GGTAGGTTAA	CTATGCATTA	720
721	CTCACCTGTT	CGGCACITTC	ACCTCATAGA	AGGGAGGATT	ACGTAAAGACT	TGCTTGCCTA	ATCCATGGGA	TGGTTTTCTT	TTTATTAATT	AAACATAACA	AAACGAAAGT	CATAAGTAG	840
841	TATCGCTGGT	ATATTTCTG											859



## APENDICE V

### VERIFICAÇÃO DOS SISTEMAS A E B PARA AVALIAÇÃO DA NORMALIDADE E HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS COM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS REDUÇÃO DE AMÔNIA, REDUÇÃO DE NITRITO E FORMAÇÃO DE NITRATO

Duas premissas para uso de testes paramétrico é que as amostras coletadas para uma dada variável apresentem uma distribuição normal e tenham variâncias homogêneas. A discordância com apenas uma dessas premissas já invalida o uso de testes paramétricos.

Para testar se a distribuição dos dados se desvia de uma distribuição normal utilizou-se os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk, que comparam escores de uma amostra a uma distribuição normal modelo de mesma média e variância dos valores encontrados nas amostras. Nessa primeira etapa da análise da normalidade considerou-se as amostras coletadas ao longo dos testes e intervalos de tempos como independentes. Uma vez que, para o objetivo de comparar se os sistemas A e B montados com cada tipo de inóculo representavam duplicatas, essa análise de normalidade se aplica.

Lembrando que para esses testes foram utilizados os dados brutos de redução de amônia e nitrito e acréscimo de nitrato em mM.

Numa primeira análise utilizou-se a comparação de normalidade e homogeneidade considerando-se o comportamento dos íons (amônia, nitrito, nitrato), tendo os dados para cada sistema componente da duplicata (A e B). Dessa maneira, considerou-se a concentração dos íons independentemente dos intervalos em que eles foram coletados. A homogeneidade foi avaliada usando a comparação da variância de um dado íon, se igual ou diferente entre os sistemas A e B.

**Dessa maneira, com relação à redução na concentração de amônia tem-se:**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estatística	Df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Am_ParA	,138	50	,018	,909	50	,001
Am_ParB	,107	50	,200*	,942	50	,016

Am_AnF1A	,135	50	,023	,943	50	,018
Am_AnF1B	,093	50	,200	,955	50	,055
Am_FaF1A	,163	50	,002	,919	50	,002
Am_FaF1B	,147	50	,009	,901	50	,001
Am_FaF2A	,161	50	,002	,925	50	,004
Am_FaF2B	,179	50	,000	,867	50	,000
Am_UaF2A	,271	50	,000	,751	50	,000
Am_UaF2B	,205	50	,000	,860	50	,000
Am_ChoA	,135	50	,024	,909	50	,001
Am_ChoB	,117	50	,087	,899	50	,000

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Para todos os sistemas, com exceção dos sistemas Am\_ParB e Am\_AnF1B, diferiram significativamente da distribuição normal com  $p < 0,01$  pelo teste de Shapiro Wilk que é mais robusto para amostra pequenas ( $n=50$ ) do que o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados de concentração de amônia sistema Am\_ParB foi diferente da distribuição normal com  $p < 0,05$  pelo teste de Shapiro-Wilk, enquanto o Am\_AnF1B não diferiu significativamente da distribuição normal pelo teste de Shapiro Wilk, com  $p > 0,05$ . Com relação aos resultados obtidos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, todos os sistemas, à exceção dos pares de sistema Am\_ParA e Am\_ParB; Am\_AnF1A e Am\_AnF1B; Am\_ChoA e Am\_ChoB, também diferiram significativamente da distribuição normal com  $p < 0,01$ . Por esse teste os sistemas Am\_PaB; Am\_AnF1B; Am\_ChoB não diferiram significativamente da distribuição normal com  $p > 0,05$ .

**Dessa maneira, com relação à redução na concentração de nitrito tem-se:**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estatística	Df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Ni_ParA	,148	50	,008	,896	50	,000
Ni_ParB	,145	50	,011	,912	50	,001
Ni_AnF1A	,133	50	,027	,902	50	,001
Ni_AnF1B	,214	50	,000	,801	50	,000
Ni_FaF1A	,214	50	,000	,851	50	,000
Ni_FaF1B	,151	50	,006	,904	50	,001
Ni_FaF2A	,126	50	,046	,884	50	,000

Ni_FaF2B	,159	50	,003	,908	50	,001
Ni_UaF2A	,240	50	,000	,779	50	,000
Ni_UaF2B	,159	50	,003	,864	50	,000
Ni_ChoA	,169	50	,001	,923	50	,003
Ni_ChoB	,111	50	,170	,931	50	,006

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Para todos os sistemas os dados coletados para a concentração de nitrito diferiram significativamente da distribuição normal com  $p < 0,01$  pelo teste de Shapiro Wilk que é mais robusto para amostra pequenas ( $n \leq 50$ ) do que o teste de Kolmogorov-Smirnov. Com relação ao teste de Kolmogorov-Smirnov todos os sistemas, a exceção do Ni\_ChoB, também apresentaram distribuição diferente da normal com  $p < 0,01$  e ou a  $p < 0,05$ .

**Dessa maneira, com relação ao aumento na concentração de nitrato tem-se:**

	Testes de Normalidade					
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estatística	Df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Na_ParA	,206	50	,000	,806	50	,000
Na_ParB	,249	50	,000	,793	50	,000
Na_AnF1A	,257	50	,000	,776	50	,000
Na_AnF1B	,343	50	,000	,580	50	,000
Na_FaF1A	,349	50	,000	,624	50	,000
Na_FaF1B	,241	50	,000	,765	50	,000
Na_FaF2A	,269	50	,000	,693	50	,000
Na_FaF2B	,264	50	,000	,790	50	,000
Na_UaF2A	,259	50	,000	,823	50	,000
Na_UaF2B	,273	50	,000	,778	50	,000
Na_ChoA	,200	50	,000	,788	50	,000
Na_ChoB	,183	50	,000	,872	50	,000

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Para todos os sistemas os dados coletados para a concentração de nitrato diferiram significativamente da distribuição normal com  $p < 0,01$  tanto pelo teste de Shapiro Wilk quanto o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Com relação à homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene tem-se:

**Entre o par ParA e ParB**

**Teste de Homogeneidade de Variância**

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	1,855	1	98	,176
	Com base em mediana	,751	1	98	,388
	Com base em mediana e com df ajustado	,751	1	83,264	,389
	Com base em média aparada	1,499	1	98	,224
Nitrito	Com base em média	,191	1	98	,663
	Com base em mediana	,166	1	98	,685
	Com base em mediana e com df ajustado	,166	1	96,701	,685
	Com base em média aparada	,171	1	98	,680
Nitrato	Com base em média	,027	1	98	,869
	Com base em mediana	,138	1	98	,711
	Com base em mediana e com df ajustado	,138	1	97,634	,711
	Com base em média aparada	,032	1	98	,859

**Entre o par AnF1A e AnF1B**

**Teste de Homogeneidade de Variância**

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	1,120	1	98	,292
	Com base em mediana	,975	1	98	,326
	Com base em mediana e com df ajustado	,975	1	93,122	,326
	Com base em média aparada	1,020	1	98	,315
Nitrito	Com base em média	,128	1	98	,721
	Com base em mediana	,459	1	98	,500
	Com base em mediana e com df ajustado	,459	1	83,418	,500
	Com base em média aparada	,204	1	98	,652
Nitrato	Com base em média	4,084	1	98	,046
	Com base em mediana	2,862	1	98	,094
	Com base em mediana e com df ajustado	2,862	1	96,748	,094
	Com base em média aparada	5,096	1	98	,026

### Entre o par FaF1A e FaF1B

Teste de Homogeneidade de Variância

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	5,915	1	98	,017
	Com base em mediana	4,636	1	98	,034
	Com base em mediana e com df ajustado	4,636	1	95,171	,034
	Com base em média aparada	5,808	1	98	,018
Nitrito	Com base em média	,580	1	98	,448
	Com base em mediana	,200	1	98	,656
	Com base em mediana e com df ajustado	,200	1	91,026	,656
	Com base em média aparada	,512	1	98	,476
Nitrato	Com base em média	,030	1	98	,864
	Com base em mediana	,199	1	98	,656
	Com base em mediana e com df ajustado	,199	1	93,267	,656
	Com base em média aparada	,002	1	98	,967

### Entre o par FaF2A e FaF2B

Teste de Homogeneidade de Variância

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	,116	1	98	,734
	Com base em mediana	,023	1	98	,881
	Com base em mediana e com df ajustado	,023	1	96,248	,881
	Com base em média aparada	,054	1	98	,817
Nitrito	Com base em média	,002	1	98	,967
	Com base em mediana	,073	1	98	,787
	Com base em mediana e com df ajustado	,073	1	97,932	,787
	Com base em média aparada	,001	1	98	,972
Nitrato	Com base em média	2,811	1	98	,097
	Com base em mediana	1,487	1	98	,226
	Com base em mediana e com df ajustado	1,487	1	95,767	,226
	Com base em média aparada	2,859	1	98	,094

**Entre o par UaF2A e UaF2B**

**Teste de Homogeneidade de Variância**

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	,017	1	98	,895
	Com base em mediana	,070	1	98	,791
	Com base em mediana e com df ajustado	,070	1	93,745	,791
	Com base em média aparada	,007	1	98	,935
Nitrito	Com base em média	2,143	1	98	,146
	Com base em mediana	,320	1	98	,573
	Com base em mediana e com df ajustado	,320	1	85,252	,573
	Com base em média aparada	1,347	1	98	,249
Nitrito	Com base em média	17,559	1	98	,000
	Com base em mediana	6,870	1	98	,010
	Com base em mediana e com df ajustado	6,870	1	67,017	,011
	Com base em média aparada	14,226	1	98	,000

**Entre o par ChoA e ChoB**

**Teste de Homogeneidade de Variância**

		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Amônia	Com base em média	8,717	1	98	,004
	Com base em mediana	7,056	1	98	,009
	Com base em mediana e com df ajustado	7,056	1	75,435	,010
	Com base em média aparada	7,977	1	98	,006
Nitrito	Com base em média	1,256	1	98	,265
	Com base em mediana	1,322	1	98	,253
	Com base em mediana e com df ajustado	1,322	1	97,357	,253
	Com base em média aparada	1,333	1	98	,251
Nitrito	Com base em média	2,759	1	98	,100
	Com base em mediana	1,844	1	98	,178
	Com base em mediana e com df ajustado	1,844	1	95,433	,178
	Com base em média aparada	2,687	1	98	,104

## COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS A E B DURANTE A ETAPA 2

Os dados obtidos de conversão das formas nitrogenadas presentes na amostras, ao longo dos tempos de cada teste e também com o número do teste, que irá refletir numa variável tempo, visto que o teste sucessor ao anterior representa maior tempo que a biomassa encontra-se dentro do sistema e com isso maior aclimação e enriquecimento dos grupos de micro-organismos que melhor se desenvolveram dadas as condições estabelecidas, são considerados não paramétricos visto que não correspondem aos pressupostos de normalidade e homogeneidade. A não normalidade e homogeneidade dos dados eram esperados dado as características das informações coletadas, visto que, a conversão das formas nitrogenadas dependia das densidades dos grupos de micro-organismos presentes nos inóculos bem como das concentrações dos substratos limitantes e das concentrações de substâncias inibitórias a cada grupo de micro-organismos. Dessa maneira torna-se necessário a adoção de testes não paramétricos para interpretação dos resultados obtidos.

Comparação entre os sistemas A e B de cada inóculo da etapa 2 para verificar se os mesmos continuaram a agir como duplicatas na conversão dos compostos nitrogenados. Para tanto realizou-se testes de hipóteses, sendo  $H_0 = F(\text{Sistema A}) = F(\text{Sistema B})$ ;  $H_1 = F(\text{Sistema A}) \neq F(\text{Sistema B})$ ;

Nesse teste não existe uma previsão de qual sistema apresentou maior ou menor conversão, então considera-se apenas a igualdade e desigualdade entre os valores lidos de conversão para amônia, nitrito e nitrato e, portanto, busca-se uma análise bilateral.

Para esse teste os sistemas foram considerados como variáveis dependentes, visto que as mesmas estavam sendo avaliadas para checar a igualdade ou não, ou seja considerou elas como emparelhadas, como se fossem provenientes de um único sistema.

### **Nesse caso utilizou-se o teste dos postos com sinais de Wilcoxon.**

Nesse teste calcula-se a diferença entre as observações de cada amostra (teste e tempo) das duas variáveis dependentes, nesse caso sistema A e sistema B, e depois essas diferenças são transformadas em postos, mas o sinal da diferença (se positiva ou negativa) é atribuído a cada posto. Ao final separa-se os postos com sinais negativos e positivos, e obtém-se a soma dos postos com mesmos sinais. A estatística desse teste (T) é utilizar o menor dos dois valores obtidos na soma dos postos com sinais diferentes (que será o valor T).



A significância do teste é obtida com o cálculo da média  $\bar{T}$  e do erro padrão do teste ( $EP_T$ ) do teste para cálculo de Z, de acordo com as equações:

$$\bar{T} = \frac{n(n+1)}{4}$$
$$EP_T = \sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}}$$
$$Z = \frac{T - \bar{T}}{EP_T}$$

**1) Dessa maneira tem-se para as conversões de amônia para os sistemas A e B:**

Para os sistemas com inóculo proveniente da Lago Paranoá de Brasília (Par), as reduções nas concentrações de amônia, ao longo dos perfis temporais de cada teste e ao longo do conjunto de teste, foram significativamente mais altas para o sistema denominado de ParA (Média = 0,300; Mediana = 0,232) do que para o sistema denominado de ParB (Média = 0,274; Mediana = 0,256), com  $T = 447,0$  e  $Z = -1,839$   $p < 0,05$ . Dessa maneira, esses sistemas A e B com relação à redução de amônia não podem ser utilizados como duplicatas.

Para os sistemas com inóculo proveniente da Lagoa Anaeróbia do Frigorífico 1 (AnF1), as reduções nas concentrações de amônia, ao longo dos perfis temporais de cada teste e ao longo do conjunto de teste, foram significativamente mais altas para o sistema denominado de AnF1A (Média = 0,248; Mediana = 0,23) do que para o sistema denominado de AnF1B (Média = 0,195; Mediana = 0,171), com  $T = 267,0$  e  $Z = -3,577$   $p < 0,01$ . Dessa maneira, esses sistemas A e B com relação à redução de amônia não podem ser utilizados como duplicatas.

Para os sistemas com inóculo proveniente da Lagoa Facultativa do Frigorífico 1 (FaF1), as reduções nas concentrações de amônia, ao longo dos perfis temporais de cada teste e ao longo do conjunto de teste, foram significativamente mais altas para o sistema denominado de FaF1A (Média = 0,359; Mediana = 0,293) do que para o sistema denominado de FaF1B (Média = 0,261; Mediana = 0,208), com  $T = 299,5$  e  $Z = -3,263$   $p < 0,01$ . Dessa maneira, esses sistemas A e B com relação à redução de amônia não podem ser utilizados como duplicatas.

Para os sistemas com inóculo proveniente da Lagoa de Acumulação de Chorume do Aterro Controlado Jockey Club, de Brasília (Cho), as reduções nas concentrações de amônia, ao longo dos perfis temporais de cada teste e ao longo do conjunto de teste, foram significativamente mais altas para o sistema denominado de ChoB (Média = 0,326; Mediana = 0,341) do que para o sistema denominado de ChoA (Média = 0,257; Mediana = 0,228), com  $T =$

264,0 e  $Z = -3,606$   $p < 0,01$ . Dessa maneira, esses sistemas A e B com relação à redução de amônia não podem ser utilizados como duplicatas.

Para todos os demais pares de sistemas, com relação a redução de amônia, FaF2A e FaF2B; UaF2A e UaF2B, não diferiram entre si quando comparados aplicando o teste dos postos com sinais de Wilcoxon, utilizando  $p < 0,05$  (Os resultados dos testes podem ser verificados no Apêndice I – Resultados dos Testes Estatísticos).

#### Estadísticas descritivas

	N	Média	Erro Desvio	Mínimo	Máximo	Percentis		
						25o.	50° (Mediana)	75°
Am_ParA	50	,30058	,233764	,013	,860	,09275	,23250	,46350
Am_AnF1A	50	,24892	,151988	,022	,606	,14200	,23000	,32700
Am_FaF1A	50	,35900	,267474	-,010	,899	,14125	,29300	,51800
Am_FaF2A	50	,28872	,243593	-,123	,845	,10975	,20850	,51400
Am_UaF2A	50	,29256	,316311	,006	1,048	,07525	,18300	,34475
Am_ChoA	50	,25758	,195518	,015	,735	,09575	,22850	,37425
Am_ParB	50	,27418	,190449	,001	,700	,09650	,25650	,38900
Am_AnF1B	50	,19570	,123512	,005	,483	,11325	,17050	,28225
Am_FaF1B	50	,26076	,203511	-,001	,677	,08950	,20800	,42625
Am_FaF2B	50	,30874	,263279	,010	1,124	,11400	,22050	,53650
Am_UaF2B	50	,31474	,284831	,004	,949	,07900	,20150	,57700
Am_ChoB	50	,39528	,326492	,006	1,199	,14225	,34100	,53100

#### Teste de Classificações Assinadas por Wilcoxon

##### Classificações

		N	Postos de média	Soma de Classificações
Am_ParB - Am_ParA	Classificações Negativas	32 <sup>a</sup>	25,88	828,00
	Classificações Positivas	18 <sup>b</sup>	24,83	447,00
	Vínculos	0 <sup>c</sup>		
	Total	50		
Am_AnF1B - Am_AnF1A	Classificações Negativas	32 <sup>d</sup>	31,50	1008,00
	Classificações Positivas	18 <sup>e</sup>	14,83	267,00
	Vínculos	0 <sup>f</sup>		
	Total	50		

Am_FaF1B - Am_FaF1A	Classificações Negativas	32 <sup>g</sup>	30,48	975,50
	Classificações Positivas	18 <sup>h</sup>	16,64	299,50
	Vínculos	0 <sup>i</sup>		
	Total	50		
Am_FaF2B - Am_FaF2A	Classificações Negativas	34 <sup>j</sup>	22,44	763,00
	Classificações Positivas	16 <sup>k</sup>	32,00	512,00
	Vínculos	0 <sup>l</sup>		
	Total	50		
Am_UaF2B - Am_UaF2A	Classificações Negativas	32 <sup>m</sup>	22,14	708,50
	Classificações Positivas	18 <sup>n</sup>	31,47	566,50
	Vínculos	0 <sup>o</sup>		
	Total	50		
Am_ChoB - Am_ChoA	Classificações Negativas	16 <sup>p</sup>	16,50	264,00
	Classificações Positivas	34 <sup>q</sup>	29,74	1011,00
	Vínculos	0 <sup>r</sup>		
	Total	50		

- a. Am\_ParB < Am\_ParA  
b. Am\_ParB > Am\_ParA  
c. Am\_ParB = Am\_ParA  
d. Am\_AnF1B < Am\_AnF1A  
e. Am\_AnF1B > Am\_AnF1A  
f. Am\_AnF1B = Am\_AnF1A  
g. Am\_FaF1B < Am\_FaF1A  
h. Am\_FaF1B > Am\_FaF1A  
i. Am\_FaF1B = Am\_FaF1A  
j. Am\_FaF2B < Am\_FaF2A  
k. Am\_FaF2B > Am\_FaF2A  
l. Am\_FaF2B = Am\_FaF2A  
m. Am\_UaF2B < Am\_UaF2A  
n. Am\_UaF2B > Am\_UaF2A  
o. Am\_UaF2B = Am\_UaF2A  
p. Am\_ChoB < Am\_ChoA  
q. Am\_ChoB > Am\_ChoA  
r. Am\_ChoB = Am\_ChoA

#### Estadísticas de teste<sup>a</sup>

	Am_ParB - Am_ParA	Am_AnF1B - Am_AnF1A	Am_FaF1B - Am_FaF1A	Am_FaF2B - Am_FaF2A	Am_UaF2B - Am_UaF2A	Am_ChoB - Am_ChoA
Z	-1,839 <sup>b</sup>	-3,577 <sup>b</sup>	-3,263 <sup>b</sup>	-1,212 <sup>b</sup>	-,685 <sup>b</sup>	-3,606 <sup>c</sup>
Significância Sig. (2 extremidades)	,066	,000	,001	,226	,493	,000

Sig exata (2 extremidades)	,066	,000	,001	,229	,498	,000
Sig exata (1 extremidade)	,033	,000	,000	,114	,249	,000
Probabilidade de ponto	,000	,000	,000	,001	,002	,000

- Teste de Classificações Assinadas por Wilcoxon
- Com base em postos positivos.
- Com base em postos negativos.

## 2) Dessa maneira tem-se para as conversões de nitrito para os sistema A e B:

Para os sistemas com inóculo proveniente da Lagoa Anaeróbia do Frigorífico 1 (AnF1), as reduções nas concentrações de nitrito, ao longo dos perfis temporais de cada teste e ao longo do conjunto de teste, foram significativamente mais altas para o sistema denominado de AnF1A (Média = 0,459; Mediana = 0,379) do que para o sistema denominado de AnF1B (Média = 0,298; Mediana = 0,111), com  $T = 201,5$  e  $Z = -3,965$   $p < 0,01$ . Dessa maneira, esses sistemas A e B com relação à redução de nitrito não podem ser utilizados como duplicatas.

Para os sistemas com inóculo proveniente da Lagoa Facultativa do Frigorífico 1 (FaF1), as reduções nas concentrações de nitrito, ao longo dos perfis temporais de cada teste e ao longo do conjunto de teste, foram significativamente mais altas para o sistema denominado de FaF1B (Média = 0,449; Mediana = 0,349) do que para o sistema denominado de FaF1A (Média = 0,404; Mediana = 0,241), com  $T = 456,5$  e  $Z = -1,747$   $p < 0,05$ . Dessa maneira, esses sistemas A e B com relação à redução de nitrito não podem ser utilizados como duplicatas.

Para os sistemas com inóculo proveniente do Reator Uasb do Frigorífico 2 (UaF2), as reduções nas concentrações de nitrito, ao longo dos perfis temporais de cada teste e ao longo do conjunto de teste, foram significativamente mais altas para o sistema denominado de UaF2B (Média = 0,356; Mediana = 0,279) do que para o sistema denominado de UaF2A (Média = 0,311; Mediana = 0,136), com  $T = 376,0$  e  $Z = -2,525$   $p < 0,01$ . Dessa maneira, esses sistemas A e B com relação à redução de nitrito não podem ser utilizados como duplicatas.

Para todos os demais pares de sistemas, com relação a redução de nitrito, PaA e PaB; FaF2A e FaF2B; ChoA e ChoB, não diferiram entre si quando comparados aplicando o teste dos postos

com sinais de Wilcoxon, utilizando  $p < 0,05$  (Os resultados dos testes podem ser verificados no Apêndice I – Resultados dos Testes Estatísticos).

#### Estadísticas descritivas

	N	Média	Erro Desvio	Mínimo	Máximo	Percentis		
						25o.	50° (Mediana)	75°
Ni_ParA	50	,40216	,310076	,030	1,040	,10925	,40050	,51375
Ni_AnF1A	50	,45864	,359754	,000	1,062	,15000	,37850	,78925
Ni_FaF1A	50	,40354	,389756	-,038	1,047	,06275	,24100	,79350
Ni_FaF2A	50	,35596	,345140	-,047	1,218	,07750	,29850	,49925
Ni_UaF2A	50	,31134	,353124	,004	1,354	,06550	,13650	,44025
Ni_ChoA	50	,46548	,302471	-,008	1,065	,23675	,41000	,78500
Ni_ParB	50	,40948	,309168	,009	,990	,13475	,38450	,61875
Ni_AnF1B	50	,29824	,363992	-,065	1,028	,02450	,11100	,52925
Ni_FaF1B	50	,44920	,356255	-,020	1,057	,09950	,34950	,78125
Ni_FaF2B	50	,44786	,318491	,014	1,066	,24425	,33950	,66050
Ni_UaF2B	50	,35582	,286394	,015	1,150	,14475	,27950	,44225
Ni_ChoB	50	,52582	,333138	,005	1,031	,20425	,50250	,85250

#### Classificações

		N	Postos de média	Soma de Classificações
Ni_ParB - Ni_ParA	Classificações Negativas	28 <sup>a</sup>	22,18	621,00
	Classificações Positivas	22 <sup>b</sup>	29,73	654,00
	Vínculos	0 <sup>c</sup>		
	Total	50		
Ni_AnF1B - Ni_AnF1A	Classificações Negativas	38 <sup>d</sup>	25,64	974,50
	Classificações Positivas	10 <sup>e</sup>	20,15	201,50
	Vínculos	2 <sup>f</sup>		
	Total	50		
Ni_FaF1B - Ni_FaF1A	Classificações Negativas	22 <sup>g</sup>	20,75	456,50
	Classificações Positivas	28 <sup>h</sup>	29,23	818,50
	Vínculos	0 <sup>i</sup>		
	Total	50		
Ni_FaF2B - Ni_FaF2A	Classificações Negativas	20 <sup>j</sup>	23,43	468,50
	Classificações Positivas	30 <sup>k</sup>	26,88	806,50
	Vínculos	0 <sup>l</sup>		
	Total	50		
Ni_UaF2B - Ni_UaF2A	Classificações Negativas	14 <sup>m</sup>	26,86	376,00

	Classificações Positivas	36 <sup>n</sup>	24,97	899,00
	Vínculos	0 <sup>o</sup>		
	Total	50		
Ni_ChoB - Ni_ChoA	Classificações Negativas	26 <sup>p</sup>	19,94	518,50
	Classificações Positivas	24 <sup>q</sup>	31,52	756,50
	Vínculos	0 <sup>r</sup>		
	Total	50		

- a. Ni\_ParB < Ni\_ParA
- b. Ni\_ParB > Ni\_ParA
- c. Ni\_ParB = Ni\_ParA
- d. Ni\_AnF1B < Ni\_AnF1A
- e. Ni\_AnF1B > Ni\_AnF1A
- f. Ni\_AnF1B = Ni\_AnF1A
- g. Ni\_FaF1B < Ni\_FaF1A
- h. Ni\_FaF1B > Ni\_FaF1A
- i. Ni\_FaF1B = Ni\_FaF1A
- j. Ni\_FaF2B < Ni\_FaF2A
- k. Ni\_FaF2B > Ni\_FaF2A
- l. Ni\_FaF2B = Ni\_FaF2A
- m. Ni\_UaF2B < Ni\_UaF2A
- n. Ni\_UaF2B > Ni\_UaF2A
- o. Ni\_UaF2B = Ni\_UaF2A
- p. Ni\_ChoB < Ni\_ChoA
- q. Ni\_ChoB > Ni\_ChoA
- r. Ni\_ChoB = Ni\_ChoA

**Estatísticas de teste<sup>a</sup>**

	Ni_ParB - Ni_ParA	Ni_AnF1B - Ni_AnF1A	Ni_FaF1B - Ni_FaF1A	Ni_FaF2B - Ni_FaF2A	Ni_UaF2B - Ni_UaF2A	Ni_ChoB - Ni_ChoA
Z	-,159 <sup>b</sup>	-3,965 <sup>c</sup>	-1,747 <sup>b</sup>	-1,631 <sup>b</sup>	-2,525 <sup>b</sup>	-1,149 <sup>b</sup>
Significância Sig. (2 extremidades)	,873	,000	,081	,103	,012	,251
Sig exata (2 extremidades)	,876	,000	,081	,104	,011	,254
Sig exata (1 extremidade)	,438	,000	,040	,052	,005	,127
Probabilidade de ponto	,002	,000	,000	,001	,000	,001

- a. Teste de Classificações Assinadas por Wilcoxon
- b. Com base em postos negativos.
- c. Com base em postos positivos.

### 3) Dessa maneira tem-se para as conversões de nitrato para os sistemas A e B:

Para os sistemas com inóculo proveniente da Lagoa Anaeróbia do Frigorífico 1 (AnF1), as produções de nitrato, ao longo dos perfis temporais de cada teste e ao longo do conjunto de teste, foram significativamente mais altas para o sistema denominado de AnF1A (Média = 0,365; Mediana = 0,163) do que para o sistema denominado de AnF1B (Média = 0,190; Mediana = 0,013), com  $T = 252,0$  e  $Z = -3,586$   $p < 0,01$ . Dessa maneira, esses sistemas A e B com relação à formação de nitrato não podem ser utilizados como duplicatas.

Para todos os demais pares de sistemas, com relação a produção de nitrato, PaA e PaB; FaF1A e FaF1; FaF2A e FaF2B; UaF2A e UaF2B; ChoA e ChoB, não diferiram entre si quando comparados aplicando o teste dos postos com sinais de Wilcoxon, utilizando  $p < 0,05$  (Os resultados dos testes podem ser verificados no Apêndice I – Resultados dos Testes Estatísticos).

**Estatísticas descritivas**

	N	Média	Erro Desvio	Mínimo	Máximo	Percentis		
						25o.	50° (Mediana)	75°
Na_ParA	50	,30448	,341393	-,027	1,121	,05175	,18900	,45750
Na_AnF1A	50	,36572	,392693	-,013	1,023	,06925	,16300	,86850
Na_FaF1A	50	,23000	,387236	-,012	1,102	,00150	,02000	,22100
Na_FaF2A	50	,20142	,304359	-,077	1,119	,03175	,07050	,24925
Na_UaF2A	50	,01450	,024215	-,049	,075	,00450	,01000	,01625
Na_ChoA	50	,27520	,305350	-,001	1,017	,04225	,13050	,36075
Na_ParB	50	,30112	,324668	-,010	1,067	,07200	,14850	,42625
Na_AnF1B	50	,19040	,363872	-,046	1,150	,00175	,01300	,12600
Na_FaF1B	50	,28736	,365754	-,007	1,170	,02500	,13450	,45375
Na_FaF2B	50	,26412	,377476	-,242	1,145	,04000	,09800	,34025
Na_UaF2B	50	,02554	,051688	-,026	,162	-,00275	,00450	,03475
Na_ChoB	50	,33286	,339992	-,049	1,037	,02175	,21700	,59375

**Classificações**

		N	Postos de média	Soma de Classificações
Na_ParB - Na_ParA	Classificações Negativas	22 <sup>a</sup>	28,14	619,00
	Classificações Positivas	28 <sup>b</sup>	23,43	656,00
	Vínculos	0 <sup>c</sup>		
	Total	50		

Na_AnF1B - Na_AnF1A	Classificações Negativas	38 <sup>d</sup>	25,61	973,00
	Classificações Positivas	11 <sup>e</sup>	22,91	252,00
	Vínculos	1 <sup>f</sup>		
	Total	50		
Na_FaF1B - Na_FaF1A	Classificações Negativas	24 <sup>g</sup>	18,92	454,00
	Classificações Positivas	24 <sup>h</sup>	30,08	722,00
	Vínculos	2 <sup>i</sup>		
	Total	50		
Na_FaF2B - Na_FaF2A	Classificações Negativas	26 <sup>j</sup>	22,06	573,50
	Classificações Positivas	24 <sup>k</sup>	29,23	701,50
	Vínculos	0 <sup>l</sup>		
	Total	50		
Na_UaF2B - Na_UaF2A	Classificações Negativas	27 <sup>m</sup>	21,28	574,50
	Classificações Positivas	22 <sup>n</sup>	29,57	650,50
	Vínculos	1 <sup>o</sup>		
	Total	50		
Na_ChoB - Na_ChoA	Classificações Negativas	22 <sup>p</sup>	22,50	495,00
	Classificações Positivas	28 <sup>q</sup>	27,86	780,00
	Vínculos	0 <sup>r</sup>		
	Total	50		

a. Na\_ParB < Na\_ParA

b. Na\_ParB > Na\_ParA

c. Na\_ParB = Na\_ParA

d. Na\_AnF1B < Na\_AnF1A

e. Na\_AnF1B > Na\_AnF1A

f. Na\_AnF1B = Na\_AnF1A

g. Na\_FaF1B < Na\_FaF1A

h. Na\_FaF1B > Na\_FaF1A

i. Na\_FaF1B = Na\_FaF1A

j. Na\_FaF2B < Na\_FaF2A

k. Na\_FaF2B > Na\_FaF2A

l. Na\_FaF2B = Na\_FaF2A

m. Na\_UaF2B < Na\_UaF2A

n. Na\_UaF2B > Na\_UaF2A

o. Na\_UaF2B = Na\_UaF2A

p. Na\_ChoB < Na\_ChoA

q. Na\_ChoB > Na\_ChoA

r. Na\_ChoB = Na\_ChoA



Estadísticas de teste<sup>a</sup>

	Na_ParB - Na_ParA	Na_AnF1B - Na_AnF1A	Na_FaF1B - Na_FaF1A	Na_FaF2B - Na_FaF2A	Na_UaF2B - Na_UaF2A	Na_ChoB - Na_ChoA
Z	-,179 <sup>b</sup>	-3,586 <sup>c</sup>	-1,375 <sup>b</sup>	-,618 <sup>b</sup>	-,378 <sup>b</sup>	-1,376 <sup>b</sup>
Significância Sig. (2 extremidades)	,858	,000	,169	,537	,705	,169
Sig exata (2 extremidades)	,861	,000	,172	,541	,710	,171
Sig exata (1 extremidade)	,431	,000	,086	,271	,355	,086
Probabilidade de ponto	,002	,000	,001	,002	,002	,001

a. Teste de Classificações Assinadas por Wilcoxon

b. Com base em postos negativos.

c. Com base em postos positivos.

A tabela XX, apresenta os resultados sintetizados com relação às conversões ocorridas nas formas nitrogenadas dos sistemas operados com o mesmo tipo de inóculo, com a finalidade de avaliar se os sistemas permaneciam como representantes de duplicatas. O teste aplicado foi o dos postos com sinais de Wilcoxon.

Sistema	Amônia	Nitrito	Nitrato	Representam duplicatas
ParA	Não	Sim	Sim	Não
ParB	Não	Sim	Sim	Não
AnF1A	Não	Não	Não	Não
AnF1B	Não	Não	Não	Não
FaF1A	Não	Não	Sim	Não
FaF1B	Não	Não	Sim	Não
<b>FaF2A</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>
<b>FaF2B</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>
UaF2A	Sim	Não	Sim	Não
UaF2B	Sim	Não	Sim	Não
ChoA	Não	Sim	Sim	Não
ChoB	Não	Sim	Sim	Não

Acrescentar comentários do Livro sobre organização dos sistemas biológicos

**OUTRA FORMA EM QUE FORAM TESTADOS A NORMALIDADE E HOMOGENEIDADE DOS  
DADOS DA DUPLICATAS.**

Lembrando que para esses testes foram utilizados os dados brutos de redução de amônia e nitrito e acréscimo de nitrato em mM, obtidas pela diferença entre os tempos de coleta de amostras dentro de cada batelada. Dessa maneira, como os intervalos de tempo se configuram como variáveis interferindo nas concentrações dos íons em análise, fez também uma avaliação da distribuição normal e homogeneidade entre as duplicatas considerando esse fator.

Numa segunda análise utilizou-se a comparação de normalidade e homogeneidade considerando-se o comportamento dos íons (amônia, nitrito, nitrato) obtidas para cada intervalo de tempo dado o início de cada bateladas, sendo eles (T0\_T1 ⇔ 0\_24 horas; T1\_T2 ⇔ 24\_48 horas; T1\_T2 ⇔ 0\_48 horas; T2\_T3 ⇔ 48\_72 horas; T0\_T3 ⇔ 0\_72 horas), consistindo em 10 bateladas para cada sistema componente da duplicata (A e B). A homogeneidade foi avaliada usando a comparação da variância de um dado íon, se igual ou diferente entre os sistemas A e B, mas tendo a observância de analisar se a variância dentro de cada intervalo foi homogênea ou heterogênea para cada sistema componente da duplicata.

**Sistemas Par A e ParB**

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	ParA	,253	10	,068	,818	10	,024
		ParB	,292	10	,015	,744	10	,003
T0_T2	Amônia	ParA	,273	10	,033	,759	10	,005
		ParB	,153	10	,200*	,940	10	,553
T0_T3	Amônia	ParA	,255	10	,064	,827	10	,031
		ParB	,225	10	,166	,926	10	,408
T1_T2	Amônia	ParA	,311	10	,007	,798	10	,014
		ParB	,200	10	,200*	,918	10	,338
T2_T3	Amônia	ParA	,314	10	,006	,682	10	,001
		ParB	,386	10	,000	,684	10	,001

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	,004	1	18	,948
		Com base em mediana	,018	1	18	,896
		Com base em mediana e com df ajustado	,018	1	16,548	,896
		Com base em média aparada	,001	1	18	,970
T0_T2	Amônia	Com base em média	5,137	1	18	,036
		Com base em mediana	,889	1	18	,358
		Com base em mediana e com df ajustado	,889	1	13,860	,362
		Com base em média aparada	4,906	1	18	,040
T0_T3	Amônia	Com base em média	8,108	1	18	,011
		Com base em mediana	2,345	1	18	,143
		Com base em mediana e com df ajustado	2,345	1	15,162	,146
		Com base em média aparada	8,197	1	18	,010
T1_T2	Amônia	Com base em média	2,365	1	18	,141
		Com base em mediana	,349	1	18	,562
		Com base em mediana e com df ajustado	,349	1	14,917	,564
		Com base em média aparada	2,177	1	18	,157
T2_T3	Amônia	Com base em média	,237	1	18	,632
		Com base em mediana	,047	1	18	,831
		Com base em mediana e com df ajustado	,047	1	17,919	,831
		Com base em média aparada	,175	1	18	,680

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estadística	df	Sig.	Estadística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	ParA	,309	10	,008	,745	10	,003
		ParB	,273	10	,033	,844	10	,050
T0_T2	Nitrito	ParA	,214	10	,200*	,868	10	,094
		ParB	,216	10	,200*	,895	10	,193
T0_T3	Nitrito	ParA	,328	10	,003	,758	10	,004
		ParB	,309	10	,007	,808	10	,018
T1_T2	Nitrito	ParA	,252	10	,071	,856	10	,068
		ParB	,222	10	,175	,832	10	,036
T2_T3	Nitrito	ParA	,206	10	,200*	,897	10	,205
		ParB	,329	10	,003	,803	10	,016

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	1,020	1	18	,326
		Com base em mediana	,223	1	18	,643
		Com base em mediana e com df ajustado	,223	1	17,094	,643
		Com base em média aparada	,896	1	18	,356
T0_T2	Nitrito	Com base em média	,415	1	18	,528
		Com base em mediana	,497	1	18	,490
		Com base em mediana e com df ajustado	,497	1	17,472	,490
		Com base em média aparada	,420	1	18	,525
T0_T3	Nitrito	Com base em média	7,638	1	18	,013
		Com base em mediana	,604	1	18	,447
		Com base em mediana e com df ajustado	,604	1	15,822	,449
		Com base em média aparada	6,864	1	18	,017
T1_T2	Nitrito	Com base em média	16,988	1	18	,001
		Com base em mediana	4,743	1	18	,043
		Com base em mediana e com df ajustado	4,743	1	11,776	,051
		Com base em média aparada	16,358	1	18	,001
T2_T3	Nitrito	Com base em média	,016	1	18	,901
		Com base em mediana	,004	1	18	,951
		Com base em mediana e com df ajustado	,004	1	16,151	,951
		Com base em média aparada	,002	1	18	,965

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.	
T0_T1	Nitrato	ParA	,297	10	,013	,743	10	,003
		ParB	,408	10	,000	,654	10	,000
T0_T2	Nitrato	ParA	,272	10	,034	,802	10	,015
		ParB	,281	10	,024	,760	10	,005
T0_T3	Nitrato	ParA	,253	10	,070	,816	10	,023
		ParB	,222	10	,177	,858	10	,072
T1_T2	Nitrato	ParA	,205	10	,200*	,849	10	,056
		ParB	,274	10	,032	,834	10	,037
T2_T3	Nitrato	ParA	,333	10	,002	,760	10	,005
		ParB	,307	10	,008	,817	10	,023

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	,684	1	18	,419
		Com base em mediana	,082	1	18	,778
		Com base em mediana e com df ajustado	,082	1	16,751	,779
		Com base em média aparada	,425	1	18	,523
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,485	1	18	,495
		Com base em mediana	,171	1	18	,684
		Com base em mediana e com df ajustado	,171	1	17,673	,684
		Com base em média aparada	,458	1	18	,507
T0_T3	Nitrato	Com base em média	1,368	1	18	,257
		Com base em mediana	,288	1	18	,598
		Com base em mediana e com df ajustado	,288	1	16,085	,599
		Com base em média aparada	1,357	1	18	,259
T1_T2	Nitrato	Com base em média	10,026	1	18	,005
		Com base em mediana	4,643	1	18	,045
		Com base em mediana e com df ajustado	4,643	1	12,315	,052
		Com base em média aparada	9,200	1	18	,007
T2_T3	Nitrato	Com base em média	,365	1	18	,553
		Com base em mediana	,095	1	18	,761
		Com base em mediana e com df ajustado	,095	1	17,975	,761
		Com base em média aparada	,341	1	18	,567

## SISTEMA AnF1A e AnF1B

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	AnF1A	,209	10	,200*	,869	10	,097
		AnF1B	,189	10	,200*	,873	10	,108
T0_T2	Amônia	AnF1A	,105	10	,200*	,967	10	,857
		AnF1B	,230	10	,143	,827	10	,031
T0_T3	Amônia	AnF1A	,209	10	,200*	,902	10	,228
		AnF1B	,274	10	,032	,827	10	,031
T1_T2	Amônia	AnF1A	,205	10	,200*	,890	10	,170
		AnF1B	,236	10	,121	,861	10	,078
T2_T3	Amônia	AnF1A	,317	10	,005	,826	10	,030
		AnF1B	,170	10	,200*	,878	10	,122

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	1,899	1	18	,185
		Com base em mediana	1,894	1	18	,186
		Com base em mediana e com df ajustado	1,894	1	17,923	,186
		Com base em média aparada	1,895	1	18	,186
T0_T2	Amônia	Com base em média	,609	1	18	,445
		Com base em mediana	,162	1	18	,692
		Com base em mediana e com df ajustado	,162	1	17,944	,692
		Com base em média aparada	,583	1	18	,455
T0_T3	Amônia	Com base em média	,005	1	18	,943
		Com base em mediana	,091	1	18	,766
		Com base em mediana e com df ajustado	,091	1	17,509	,766
		Com base em média aparada	,005	1	18	,942
T1_T2	Amônia	Com base em média	,584	1	18	,455
		Com base em mediana	,308	1	18	,586
		Com base em mediana e com df ajustado	,308	1	17,923	,586
		Com base em média aparada	,638	1	18	,435
T2_T3	Amônia	Com base em média	26,735	1	18	,000
		Com base em mediana	3,815	1	18	,067
		Com base em mediana e com df ajustado	3,815	1	10,277	,079
		Com base em média aparada	24,459	1	18	,000

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	AnF1A	,359	10	,001	,735	10	,002
		AnF1B	,299	10	,012	,740	10	,003
T0_T2	Nitrito	AnF1A	,163	10	,200*	,909	10	,276
		AnF1B	,312	10	,007	,787	10	,010
T0_T3	Nitrito	AnF1A	,297	10	,012	,804	10	,016
		AnF1B	,234	10	,129	,867	10	,092
T1_T2	Nitrito	AnF1A	,353	10	,001	,743	10	,003
		AnF1B	,378	10	,000	,679	10	,000
T2_T3	Nitrito	AnF1A	,253	10	,068	,813	10	,021
		AnF1B	,245	10	,090	,823	10	,028

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	,119	1	18	,734
		Com base em mediana	,014	1	18	,908
		Com base em mediana e com df ajustado	,014	1	17,936	,908
		Com base em média aparada	,128	1	18	,725
T0_T2	Nitrito	Com base em média	1,852	1	18	,190
		Com base em mediana	,243	1	18	,628
		Com base em mediana e com df ajustado	,243	1	12,337	,630
		Com base em média aparada	1,626	1	18	,219
T0_T3	Nitrito	Com base em média	5,703	1	18	,028
		Com base em mediana	3,984	1	18	,061
		Com base em mediana e com df ajustado	3,984	1	17,962	,061
		Com base em média aparada	5,860	1	18	,026
T1_T2	Nitrito	Com base em média	11,889	1	18	,003
		Com base em mediana	1,839	1	18	,192
		Com base em mediana e com df ajustado	1,839	1	12,256	,199
		Com base em média aparada	10,668	1	18	,004
T2_T3	Nitrito	Com base em média	,002	1	18	,969
		Com base em mediana	,008	1	18	,931
		Com base em mediana e com df ajustado	,008	1	17,971	,931
		Com base em média aparada	,002	1	18	,963

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	AnF1A	,337	10	,002	,749	10	,003
		AnF1B	,430	10	,000	,563	10	,000
T0_T2	Nitrato	AnF1A	,241	10	,105	,806	10	,017
		AnF1B	,418	10	,000	,573	10	,000
T0_T3	Nitrato	AnF1A	,311	10	,007	,735	10	,002
		AnF1B	,262	10	,051	,771	10	,006
T1_T2	Nitrato	AnF1A	,205	10	,200*	,860	10	,076
		AnF1B	,303	10	,010	,742	10	,003
T2_T3	Nitrato	AnF1A	,409	10	,000	,624	10	,000
		AnF1B	,383	10	,000	,665	10	,000

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	,664	1	18	,426
		Com base em mediana	,433	1	18	,519
		Com base em mediana e com df ajustado	,433	1	17,717	,519
		Com base em média aparada	,846	1	18	,370
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,007	1	18	,932
		Com base em mediana	,175	1	18	,681
		Com base em mediana e com df ajustado	,175	1	13,462	,682
		Com base em média aparada	,011	1	18	,916
T0_T3	Nitrato	Com base em média	,047	1	18	,831
		Com base em mediana	,005	1	18	,947
		Com base em mediana e com df ajustado	,005	1	17,808	,947
		Com base em média aparada	,061	1	18	,808
T1_T2	Nitrato	Com base em média	6,716	1	18	,018
		Com base em mediana	6,585	1	18	,019
		Com base em mediana e com df ajustado	6,585	1	12,242	,024
		Com base em média aparada	6,522	1	18	,020
T2_T3	Nitrato	Com base em média	,695	1	18	,415
		Com base em mediana	,141	1	18	,711
		Com base em mediana e com df ajustado	,141	1	16,592	,712
		Com base em média aparada	,505	1	18	,486



## Sistemas FaF1A e FaF1B

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	FaF1A	,183	10	,200*	,914	10	,311
		FaF1B	,210	10	,200*	,864	10	,084
T0_T2	Amônia	FaF1A	,176	10	,200*	,925	10	,404
		FaF1B	,202	10	,200*	,876	10	,117
T0_T3	Amônia	FaF1A	,208	10	,200*	,862	10	,080
		FaF1B	,211	10	,200*	,866	10	,090
T1_T2	Amônia	FaF1A	,241	10	,103	,839	10	,043
		FaF1B	,193	10	,200*	,873	10	,109
T2_T3	Amônia	FaF1A	,145	10	,200*	,928	10	,432
		FaF1B	,168	10	,200*	,938	10	,531

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	,713	1	18	,410
		Com base em mediana	,456	1	18	,508
		Com base em mediana e com df ajustado	,456	1	17,699	,508
		Com base em média aparada	,703	1	18	,413
T0_T2	Amônia	Com base em média	,064	1	18	,804
		Com base em mediana	,035	1	18	,854
		Com base em mediana e com df ajustado	,035	1	14,602	,855
		Com base em média aparada	,068	1	18	,797
T0_T3	Amônia	Com base em média	,512	1	18	,483
		Com base em mediana	,230	1	18	,637
		Com base em mediana e com df ajustado	,230	1	12,404	,640
		Com base em média aparada	,445	1	18	,513
T1_T2	Amônia	Com base em média	,300	1	18	,591
		Com base em mediana	,029	1	18	,866
		Com base em mediana e com df ajustado	,029	1	17,970	,866
		Com base em média aparada	,274	1	18	,607
T2_T3	Amônia	Com base em média	6,819	1	18	,018
		Com base em mediana	5,572	1	18	,030
		Com base em mediana e com df ajustado	5,572	1	13,337	,034
		Com base em média aparada	6,675	1	18	,019

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	FaF1A	,314	10	,006	,758	10	,005
		FaF1B	,246	10	,086	,870	10	,100
T0_T2	Nitrito	FaF1A	,234	10	,128	,860	10	,077
		FaF1B	,296	10	,013	,769	10	,006
T0_T3	Nitrito	FaF1A	,310	10	,007	,729	10	,002
		FaF1B	,340	10	,002	,665	10	,000
T1_T2	Nitrito	FaF1A	,247	10	,084	,833	10	,037
		FaF1B	,297	10	,012	,770	10	,006
T2_T3	Nitrito	FaF1A	,208	10	,200*	,817	10	,023
		FaF1B	,207	10	,200*	,876	10	,116

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	4,959	1	18	,039
		Com base em mediana	1,151	1	18	,297
		Com base em mediana e com df ajustado	1,151	1	11,036	,306
		Com base em média aparada	4,453	1	18	,049
T0_T2	Nitrito	Com base em média	,513	1	18	,483
		Com base em mediana	,474	1	18	,500
		Com base em mediana e com df ajustado	,474	1	17,040	,500
		Com base em média aparada	,594	1	18	,451
T0_T3	Nitrito	Com base em média	,035	1	18	,853
		Com base em mediana	,000	1	18	,983
		Com base em mediana e com df ajustado	,000	1	17,515	,983
		Com base em média aparada	,014	1	18	,908
T1_T2	Nitrito	Com base em média	1,459	1	18	,243
		Com base em mediana	,334	1	18	,570
		Com base em mediana e com df ajustado	,334	1	15,317	,572
		Com base em média aparada	1,300	1	18	,269
T2_T3	Nitrito	Com base em média	9,350	1	18	,007
		Com base em mediana	6,666	1	18	,019
		Com base em mediana e com df ajustado	6,666	1	9,877	,028
		Com base em média aparada	8,654	1	18	,009

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	FaF1A	,422	10	,000	,573	10	,000
		FaF1B	,216	10	,200 <sup>*</sup>	,852	10	,062
T0_T2	Nitrato	FaF1A	,346	10	,001	,639	10	,000
		FaF1B	,289	10	,017	,793	10	,012
T0_T3	Nitrato	FaF1A	,243	10	,096	,808	10	,018
		FaF1B	,308	10	,008	,725	10	,002
T1_T2	Nitrato	FaF1A	,422	10	,000	,621	10	,000
		FaF1B	,357	10	,001	,705	10	,001
T2_T3	Nitrato	FaF1A	,436	10	,000	,578	10	,000
		FaF1B	,312	10	,007	,673	10	,000

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	5,532	1	18	,030
		Com base em mediana	,637	1	18	,435
		Com base em mediana e com df ajustado	,637	1	9,822	,444
		Com base em média aparada	3,810	1	18	,067
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,488	1	18	,494
		Com base em mediana	,297	1	18	,592
		Com base em mediana e com df ajustado	,297	1	16,938	,593
		Com base em média aparada	,631	1	18	,437
T0_T3	Nitrato	Com base em média	1,809	1	18	,195
		Com base em mediana	,143	1	18	,710
		Com base em mediana e com df ajustado	,143	1	16,184	,710
		Com base em média aparada	1,669	1	18	,213
T1_T2	Nitrato	Com base em média	111,919	1	18	,000
		Com base em mediana	5,535	1	18	,030
		Com base em mediana e com df ajustado	5,535	1	9,441	,042
		Com base em média aparada	91,358	1	18	,000
T2_T3	Nitrato	Com base em média	4,042	1	18	,060
		Com base em mediana	,567	1	18	,461
		Com base em mediana e com df ajustado	,567	1	12,470	,465
		Com base em média aparada	2,900	1	18	,106

## Sistema FaF2A e FaF2B

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	FaF2A	,208	10	,200*	,875	10	,113
		FaF2B	,181	10	,200*	,902	10	,229
T0_T2	Amônia	FaF2A	,290	10	,017	,773	10	,007
		FaF2B	,234	10	,130	,876	10	,117
T0_T3	Amônia	FaF2A	,199	10	,200*	,882	10	,139
		FaF2B	,168	10	,200*	,903	10	,235
T1_T2	Amônia	FaF2A	,252	10	,071	,886	10	,153
		FaF2B	,203	10	,200*	,868	10	,094
T2_T3	Amônia	FaF2A	,207	10	,200*	,846	10	,052
		FaF2B	,339	10	,002	,707	10	,001

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	2,653	1	18	,121
		Com base em mediana	2,671	1	18	,120
		Com base em mediana e com df ajustado	2,671	1	11,324	,130
		Com base em média aparada	2,658	1	18	,120
T0_T2	Amônia	Com base em média	1,839	1	18	,192
		Com base em mediana	,156	1	18	,697
		Com base em mediana e com df ajustado	,156	1	14,276	,698
		Com base em média aparada	1,703	1	18	,208
T0_T3	Amônia	Com base em média	,753	1	18	,397
		Com base em mediana	,458	1	18	,507
		Com base em mediana e com df ajustado	,458	1	14,780	,509
		Com base em média aparada	,696	1	18	,415
T1_T2	Amônia	Com base em média	4,616	1	18	,046
		Com base em mediana	2,375	1	18	,141
		Com base em mediana e com df ajustado	2,375	1	17,024	,142
		Com base em média aparada	4,357	1	18	,051
T2_T3	Amônia	Com base em média	1,248	1	18	,279
		Com base em mediana	,326	1	18	,575
		Com base em mediana e com df ajustado	,326	1	12,824	,578
		Com base em média aparada	,823	1	18	,376

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	FaF2A	,217	10	,200*	,850	10	,058
		FaF2B	,263	10	,049	,777	10	,008
T0_T2	Nitrito	FaF2A	,192	10	,200*	,872	10	,105
		FaF2B	,219	10	,190	,903	10	,234
T0_T3	Nitrito	FaF2A	,250	10	,076	,828	10	,032
		FaF2B	,304	10	,009	,782	10	,009
T1_T2	Nitrito	FaF2A	,211	10	,200*	,887	10	,156
		FaF2B	,283	10	,023	,846	10	,052
T2_T3	Nitrito	FaF2A	,262	10	,050	,847	10	,054
		FaF2B	,172	10	,200*	,912	10	,292

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	12,016	1	18	,003
		Com base em mediana	6,629	1	18	,019
		Com base em mediana e com df ajustado	6,629	1	14,031	,022
		Com base em média aparada	11,737	1	18	,003
T0_T2	Nitrito	Com base em média	3,175	1	18	,092
		Com base em mediana	1,890	1	18	,186
		Com base em mediana e com df ajustado	1,890	1	17,730	,186
		Com base em média aparada	3,077	1	18	,096
T0_T3	Nitrito	Com base em média	8,228	1	18	,010
		Com base em mediana	2,157	1	18	,159
		Com base em mediana e com df ajustado	2,157	1	17,243	,160
		Com base em média aparada	7,767	1	18	,012
T1_T2	Nitrito	Com base em média	,034	1	18	,855
		Com base em mediana	,008	1	18	,928
		Com base em mediana e com df ajustado	,008	1	15,863	,928
		Com base em média aparada	,034	1	18	,856
T2_T3	Nitrito	Com base em média	,589	1	18	,453
		Com base em mediana	,735	1	18	,402
		Com base em mediana e com df ajustado	,735	1	17,053	,403
		Com base em média aparada	,555	1	18	,466

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	FaF2A	,438	10	,000	,571	10	,000
		FaF2B	,368	10	,000	,722	10	,002
T0_T2	Nitrato	FaF2A	,431	10	,000	,625	10	,000
		FaF2B	,327	10	,003	,709	10	,001
T0_T3	Nitrato	FaF2A	,381	10	,000	,666	10	,000
		FaF2B	,298	10	,012	,762	10	,005
T1_T2	Nitrato	FaF2A	,390	10	,000	,705	10	,001
		FaF2B	,300	10	,011	,793	10	,012
T2_T3	Nitrato	FaF2A	,301	10	,011	,762	10	,005
		FaF2B	,357	10	,001	,756	10	,004

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	1,012	1	18	,328
		Com base em mediana	,081	1	18	,779
		Com base em mediana e com df ajustado	,081	1	15,231	,779
		Com base em média aparada	,699	1	18	,414
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,105	1	18	,749
		Com base em mediana	,005	1	18	,943
		Com base em mediana e com df ajustado	,005	1	17,566	,943
		Com base em média aparada	,077	1	18	,785
T0_T3	Nitrato	Com base em média	5,381	1	18	,032
		Com base em mediana	1,539	1	18	,231
		Com base em mediana e com df ajustado	1,539	1	17,439	,231
		Com base em média aparada	5,339	1	18	,033
T1_T2	Nitrato	Com base em média	,045	1	18	,834
		Com base em mediana	,265	1	18	,613
		Com base em mediana e com df ajustado	,265	1	17,938	,613
		Com base em média aparada	,072	1	18	,792
T2_T3	Nitrato	Com base em média	4,395	1	18	,050
		Com base em mediana	1,653	1	18	,215
		Com base em mediana e com df ajustado	1,653	1	11,207	,224
		Com base em média aparada	3,587	1	18	,074

## Sistema par UaF2A e UaF2B

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	UaF2B	,198	10	,200*	,855	10	,066
		UaF2A	,273	10	,033	,778	10	,008
T0_T2	Amônia	UaF2B	,234	10	,129	,866	10	,089
		UaF2A	,296	10	,013	,811	10	,020
T0_T3	Amônia	UaF2B	,241	10	,103	,856	10	,068
		UaF2A	,291	10	,016	,793	10	,012
T1_T2	Amônia	UaF2B	,218	10	,196	,862	10	,081
		UaF2A	,320	10	,005	,646	10	,000
T2_T3	Amônia	UaF2B	,244	10	,093	,877	10	,121
		UaF2A	,258	10	,058	,854	10	,065

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	1,049	1	18	,319
		Com base em mediana	,626	1	18	,439
		Com base em mediana e com df ajustado	,626	1	16,421	,440
		Com base em média aparada	1,055	1	18	,318
T0_T2	Amônia	Com base em média	,219	1	18	,645
		Com base em mediana	,007	1	18	,933
		Com base em mediana e com df ajustado	,007	1	15,820	,933
		Com base em média aparada	,162	1	18	,692
T0_T3	Amônia	Com base em média	1,675	1	18	,212
		Com base em mediana	,144	1	18	,708
		Com base em mediana e com df ajustado	,144	1	13,670	,710
		Com base em média aparada	1,478	1	18	,240
T1_T2	Amônia	Com base em média	,956	1	18	,341
		Com base em mediana	,081	1	18	,779
		Com base em mediana e com df ajustado	,081	1	11,210	,781
		Com base em média aparada	,591	1	18	,452
T2_T3	Amônia	Com base em média	,040	1	18	,843
		Com base em mediana	,000	1	18	,984
		Com base em mediana e com df ajustado	,000	1	17,580	,984
		Com base em média aparada	,047	1	18	,831

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	UaF2B	,343	10	,002	,775	10	,007
		UaF2A	,316	10	,005	,682	10	,001
T0_T2	Nitrito	UaF2B	,317	10	,005	,725	10	,002
		UaF2A	,372	10	,000	,696	10	,001
T0_T3	Nitrito	UaF2B	,361	10	,001	,734	10	,002
		UaF2A	,332	10	,003	,786	10	,010
T1_T2	Nitrito	UaF2B	,219	10	,191	,824	10	,028
		UaF2A	,364	10	,001	,729	10	,002
T2_T3	Nitrito	UaF2B	,189	10	,200*	,897	10	,201
		UaF2A	,269	10	,038	,806	10	,017

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	,330	1	18	,573
		Com base em mediana	,073	1	18	,790
		Com base em mediana e com df ajustado	,073	1	17,905	,790
		Com base em média aparada	,333	1	18	,571
T0_T2	Nitrito	Com base em média	5,542	1	18	,030
		Com base em mediana	,175	1	18	,681
		Com base em mediana e com df ajustado	,175	1	15,223	,682
		Com base em média aparada	4,456	1	18	,049
T0_T3	Nitrito	Com base em média	4,318	1	18	,052
		Com base em mediana	,618	1	18	,442
		Com base em mediana e com df ajustado	,618	1	15,977	,443
		Com base em média aparada	3,802	1	18	,067
T1_T2	Nitrito	Com base em média	9,737	1	18	,006
		Com base em mediana	1,031	1	18	,323
		Com base em mediana e com df ajustado	1,031	1	11,512	,331
		Com base em média aparada	8,524	1	18	,009
T2_T3	Nitrito	Com base em média	,186	1	18	,671
		Com base em mediana	,267	1	18	,612
		Com base em mediana e com df ajustado	,267	1	17,101	,612
		Com base em média aparada	,179	1	18	,678



### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	UaF2B	,356	10	,001	,702	10	,001
		UaF2A	,325	10	,004	,794	10	,012
T0_T2	Nitrato	UaF2B	,210	10	,200*	,891	10	,172
		UaF2A	,408	10	,000	,642	10	,000
T0_T3	Nitrato	UaF2B	,334	10	,002	,714	10	,001
		UaF2A	,354	10	,001	,693	10	,001
T1_T2	Nitrato	UaF2B	,284	10	,022	,860	10	,076
		UaF2A	,386	10	,000	,665	10	,000
T2_T3	Nitrato	UaF2B	,315	10	,006	,833	10	,037
		UaF2A	,161	10	,200*	,882	10	,138

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	30,192	1	18	,000
		Com base em mediana	2,870	1	18	,108
		Com base em mediana e com df ajustado	2,870	1	11,831	,116
		Com base em média aparada	26,450	1	18	,000
T0_T2	Nitrato	Com base em média	2,826	1	18	,110
		Com base em mediana	2,113	1	18	,163
		Com base em mediana e com df ajustado	2,113	1	17,477	,164
		Com base em média aparada	2,896	1	18	,106
T0_T3	Nitrato	Com base em média	56,767	1	18	,000
		Com base em mediana	4,728	1	18	,043
		Com base em mediana e com df ajustado	4,728	1	10,747	,053
		Com base em média aparada	48,891	1	18	,000
T1_T2	Nitrato	Com base em média	,063	1	18	,804
		Com base em mediana	,042	1	18	,839
		Com base em mediana e com df ajustado	,042	1	17,289	,839
		Com base em média aparada	,016	1	18	,899
T2_T3	Nitrato	Com base em média	36,981	1	18	,000
		Com base em mediana	6,280	1	18	,022
		Com base em mediana e com df ajustado	6,280	1	9,108	,033
		Com base em média aparada	33,959	1	18	,000

## Sistemas par ChoA e ChoB

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	ChoA	,266	10	,043	,860	10	,076
		ChoB	,282	10	,024	,841	10	,046
T0_T2	Amônia	ChoA	,205	10	,200*	,903	10	,238
		ChoB	,213	10	,200*	,875	10	,115
T0_T3	Amônia	ChoA	,224	10	,169	,823	10	,027
		ChoB	,262	10	,051	,810	10	,019
T1_T2	Amônia	ChoA	,279	10	,027	,816	10	,022
		ChoB	,168	10	,200*	,900	10	,217
T2_T3	Amônia	ChoA	,207	10	,200*	,872	10	,105
		ChoB	,211	10	,200*	,853	10	,064

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	1,658	1	18	,214
		Com base em mediana	,397	1	18	,536
		Com base em mediana e com df ajustado	,397	1	17,809	,537
		Com base em média aparada	1,662	1	18	,214
T0_T2	Amônia	Com base em média	2,744	1	18	,115
		Com base em mediana	1,516	1	18	,234
		Com base em mediana e com df ajustado	1,516	1	10,944	,244
		Com base em média aparada	2,580	1	18	,126
T0_T3	Amônia	Com base em média	,807	1	18	,381
		Com base em mediana	,182	1	18	,675
		Com base em mediana e com df ajustado	,182	1	13,044	,676
		Com base em média aparada	,695	1	18	,415
T1_T2	Amônia	Com base em média	9,725	1	18	,006
		Com base em mediana	9,172	1	18	,007
		Com base em mediana e com df ajustado	9,172	1	10,817	,012
		Com base em média aparada	9,445	1	18	,007
T2_T3	Amônia	Com base em média	,183	1	18	,674
		Com base em mediana	,306	1	18	,587
		Com base em mediana e com df ajustado	,306	1	17,929	,587
		Com base em média aparada	,200	1	18	,660

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	ChoA	,181	10	,200*	,921	10	,366
		ChoB	,234	10	,130	,891	10	,173
T0_T2	Nitrito	ChoA	,343	10	,002	,757	10	,004
		ChoB	,323	10	,004	,753	10	,004
T0_T3	Nitrito	ChoA	,299	10	,012	,799	10	,014
		ChoB	,262	10	,049	,803	10	,016
T1_T2	Nitrito	ChoA	,231	10	,139	,828	10	,032
		ChoB	,373	10	,000	,741	10	,003
T2_T3	Nitrito	ChoA	,211	10	,200*	,886	10	,154
		ChoB	,288	10	,019	,788	10	,010

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	3,242	1	18	,089
		Com base em mediana	3,139	1	18	,093
		Com base em mediana e com df ajustado	3,139	1	12,115	,102
		Com base em média aparada	3,344	1	18	,084
T0_T2	Nitrito	Com base em média	11,605	1	18	,003
		Com base em mediana	1,559	1	18	,228
		Com base em mediana e com df ajustado	1,559	1	12,769	,234
		Com base em média aparada	10,166	1	18	,005
T0_T3	Nitrito	Com base em média	4,754	1	18	,043
		Com base em mediana	1,229	1	18	,282
		Com base em mediana e com df ajustado	1,229	1	12,571	,288
		Com base em média aparada	4,349	1	18	,052
T1_T2	Nitrito	Com base em média	,345	1	18	,564
		Com base em mediana	,462	1	18	,505
		Com base em mediana e com df ajustado	,462	1	15,363	,507
		Com base em média aparada	,446	1	18	,513
T2_T3	Nitrito	Com base em média	3,385	1	18	,082
		Com base em mediana	2,672	1	18	,119
		Com base em mediana e com df ajustado	2,672	1	10,977	,130
		Com base em média aparada	3,096	1	18	,095

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	ChoA	,265	10	,045	,831	10	,035
		ChoB	,227	10	,153	,803	10	,016
T0_T2	Nitrato	ChoA	,336	10	,002	,748	10	,003
		ChoB	,209	10	,200*	,882	10	,138
T0_T3	Nitrato	ChoA	,265	10	,045	,785	10	,010
		ChoB	,211	10	,200*	,849	10	,057
T1_T2	Nitrato	ChoA	,357	10	,001	,746	10	,003
		ChoB	,349	10	,001	,746	10	,003
T2_T3	Nitrato	ChoA	,234	10	,127	,827	10	,031
		ChoB	,253	10	,068	,797	10	,013

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	2,896	1	18	,106
		Com base em mediana	1,279	1	18	,273
		Com base em mediana e com df ajustado	1,279	1	13,385	,278
		Com base em média aparada	2,594	1	18	,125
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,884	1	18	,359
		Com base em mediana	,009	1	18	,927
		Com base em mediana e com df ajustado	,009	1	13,564	,927
		Com base em média aparada	,812	1	18	,380
T0_T3	Nitrato	Com base em média	,069	1	18	,795
		Com base em mediana	,001	1	18	,972
		Com base em mediana e com df ajustado	,001	1	17,650	,972
		Com base em média aparada	,073	1	18	,790
T1_T2	Nitrato	Com base em média	,258	1	18	,617
		Com base em mediana	,026	1	18	,874
		Com base em mediana e com df ajustado	,026	1	17,999	,874
		Com base em média aparada	,242	1	18	,629
T2_T3	Nitrato	Com base em média	2,672	1	18	,119
		Com base em mediana	,906	1	18	,354
		Com base em mediana e com df ajustado	,906	1	11,089	,361
		Com base em média aparada	2,398	1	18	,139

## APENDICE V

### VERIFICAÇÃO DOS SISTEMAS A E B PARA AVALIAÇÃO DA NORMALIDADE E HOMOGENEIDADE DAS AMOSTRAS COM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS REDUÇÃO DE AMÔNIA, REDUÇÃO DE NITRITO E FORMAÇÃO DE NITRATO

Duas premissas para uso de testes paramétrico é que as amostras coletadas para uma dada variável apresentem uma distribuição normal e tenham variâncias homogêneas. A discordância com apenas uma dessas premissas já invalida o uso de testes paramétricos.

Para testar se a distribuição dos dados se desvia de uma distribuição normal utilizou-se os testes de Kolmogorov-Smirnov (D) e de Shapiro-Wilk (D), que comparam escores de uma amostra a uma distribuição normal modelo de mesma média e variância dos valores encontrados na amostras. Devido ao pequeno número de amostras para cada condição testada ( $n=10$ ), utilizou-se os resultados de conferência da distribuição da normal oferecida pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando o teste é não significativo ( $p>0,05$ ), infere-se que os dados da amostra não diferem significativamente de uma distribuição normal. Por outro lado, quando o teste é significativo ( $p<0,05$ ) a distribuição em questão é significativamente diferente de uma distribuição normal. Exemplo de como relatar o resultados dos testes, sendo: D (10 que é o grau de liberdade) = 0,306,  $p<0,01$ .

Para testar a homogeneidade das amostras entre os intervalos de tempos estudados, ou seja, verificar se as variâncias entre os intervalos T0\_T1; T0\_T2: T0\_T3 (que são variáveis a serem comparadas) distorciam igualmente da média entre os intervalos para cada sistema utilizou-se o teste de Levene (F). Esse teste verifica a hipótese de que a variância nos grupos é a mesma (isto é, a diferença entre as variâncias é zero). Dessa forma, se o teste de Levene é significativo quando  $p \leq 0,05$ , conclui-se que a hipótese nula é incorreta e que as variâncias são significativamente diferentes. No entanto, se o teste de Levene é não significativo (isto é  $p>0,05$ ), aceita-se a hipótese nula de que as diferenças entre as variâncias é zero, ou seja, as variâncias são estatisticamente iguais. Exemplo de como relatar o resultados dos testes, sendo: F (2, 27 que são os dois graus de liberdade) = 0,655,  $p>0,05$  ou *ns*.

Para testar se a distribuição dos dados se desvia de uma distribuição normal utilizou-se os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk, que comparam escores de uma amostra a uma distribuição normal modelo de mesma média e variância dos valores encontrados na amostras. Nessa primeira etapa da análise da normalidade considerou-se as amostras coletadas ao longo dos testes e intervalos de tempos como independentes. Uma vez que, para o objetivo de comparar se os sistemas A e B montados com cada tipo de inóculo representavam duplicatas, essa análise de normalidade se aplica.

Lembrando que para esses testes foram utilizados os dados brutos de redução de amônia e nitrito e acréscimo de nitrato em mM, obtidas pela diferença entre os tempos de coleta de amostras dentro de cada batelada. Dessa maneira, como os intervalos de tempo se configuram como variáveis interferindo nas concentrações dos íons em análise, fez também uma avaliação da distribuição normal e homogeneidade entre as duplicatas considerando esse fator.

Numa segunda análise utilizou-se a comparação de normalidade e homogeneidade considerando-se o comportamento dos íons (amônia, nitrito, nitrato) obtidas para cada intervalo de tempo dado o início de cada bateladas, sendo eles (T0\_T1 ⇔ 0\_24 horas; T1\_T2 ⇔ 24\_48 horas; T1\_T2 ⇔ 0\_48 horas; T2\_T3 ⇔ 48\_72 horas; T0\_T3 ⇔ 0\_72 horas), consistindo em 10 bateladas para cada sistema componente da duplicata (A e B). A homogeneidade foi avaliada usando a comparação da variância de um dado íon, se igual ou diferente entre os sistemas A e B, mas tendo a observância de analisar se a variância dentro de cada intervalo foram homogêneas ou heterogêneas para cada sistema componente da duplicata.

### **Sistemas Par A e ParB**

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	ParA	,253	10	,068	,818	10	,024
		ParB	,292	10	,015	,744	10	,003
T0_T2	Amônia	ParA	,273	10	,033	,759	10	,005
		ParB	,153	10	,200*	,940	10	,553
T0_T3	Amônia	ParA	,255	10	,064	,827	10	,031
		ParB	,225	10	,166	,926	10	,408
T1_T2	Amônia	ParA	,311	10	,007	,798	10	,014
		ParB	,200	10	,200*	,918	10	,338
T2_T3	Amônia	ParA	,314	10	,006	,682	10	,001
		ParB	,386	10	,000	,684	10	,001

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Exemplo Relato dos Resultados para o par PaA e PaB:**

Para todos os intervalos de tempo, com exceção dos intervalos de tempo T0\_T2; T0\_T3; T1\_T2 de Am\_ParB, diferiram significativamente da distribuição normal com  $p < 0,05$  pelo teste de Shapiro Wilk que é mais robusto para amostras pequenas ( $n < 50$ ) do que o teste de Kolmogorov-Smirnov. Com relação a homogeneidade da variância

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	,004	1	18	,948
		Com base em mediana	,018	1	18	,896
		Com base em mediana e com df ajustado	,018	1	16,548	,896
		Com base em média aparada	,001	1	18	,970
T0_T2	Amônia	Com base em média	5,137	1	18	,036
		Com base em mediana	,889	1	18	,358
		Com base em mediana e com df ajustado	,889	1	13,860	,362
		Com base em média aparada	4,906	1	18	,040
T0_T3	Amônia	Com base em média	8,108	1	18	,011
		Com base em mediana	2,345	1	18	,143
		Com base em mediana e com df ajustado	2,345	1	15,162	,146
		Com base em média aparada	8,197	1	18	,010
T1_T2	Amônia	Com base em média	2,365	1	18	,141
		Com base em mediana	,349	1	18	,562
		Com base em mediana e com df ajustado	,349	1	14,917	,564
		Com base em média aparada	2,177	1	18	,157
T2_T3	Amônia	Com base em média	,237	1	18	,632
		Com base em mediana	,047	1	18	,831
		Com base em mediana e com df ajustado	,047	1	17,919	,831
		Com base em média aparada	,175	1	18	,680

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estadística	df	Sig.	Estadística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	ParA	,309	10	,008	,745	10	,003
		ParB	,273	10	,033	,844	10	,050
T0_T2	Nitrito	ParA	,214	10	,200*	,868	10	,094
		ParB	,216	10	,200*	,895	10	,193
T0_T3	Nitrito	ParA	,328	10	,003	,758	10	,004
		ParB	,309	10	,007	,808	10	,018
T1_T2	Nitrito	ParA	,252	10	,071	,856	10	,068
		ParB	,222	10	,175	,832	10	,036
T2_T3	Nitrito	ParA	,206	10	,200*	,897	10	,205
		ParB	,329	10	,003	,803	10	,016

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors



### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	1,020	1	18	,326
		Com base em mediana	,223	1	18	,643
		Com base em mediana e com df ajustado	,223	1	17,094	,643
		Com base em média aparada	,896	1	18	,356
T0_T2	Nitrito	Com base em média	,415	1	18	,528
		Com base em mediana	,497	1	18	,490
		Com base em mediana e com df ajustado	,497	1	17,472	,490
		Com base em média aparada	,420	1	18	,525
T0_T3	Nitrito	Com base em média	7,638	1	18	,013
		Com base em mediana	,604	1	18	,447
		Com base em mediana e com df ajustado	,604	1	15,822	,449
		Com base em média aparada	6,864	1	18	,017
T1_T2	Nitrito	Com base em média	16,988	1	18	,001
		Com base em mediana	4,743	1	18	,043
		Com base em mediana e com df ajustado	4,743	1	11,776	,051
		Com base em média aparada	16,358	1	18	,001
T2_T3	Nitrito	Com base em média	,016	1	18	,901
		Com base em mediana	,004	1	18	,951
		Com base em mediana e com df ajustado	,004	1	16,151	,951
		Com base em média aparada	,002	1	18	,965

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.	
T0_T1	Nitrito	ParA	,297	10	,013	,743	10	,003
		ParB	,408	10	,000	,654	10	,000
T0_T2	Nitrito	ParA	,272	10	,034	,802	10	,015
		ParB	,281	10	,024	,760	10	,005
T0_T3	Nitrito	ParA	,253	10	,070	,816	10	,023
		ParB	,222	10	,177	,858	10	,072
T1_T2	Nitrito	ParA	,205	10	,200*	,849	10	,056
		ParB	,274	10	,032	,834	10	,037
T2_T3	Nitrito	ParA	,333	10	,002	,760	10	,005
		ParB	,307	10	,008	,817	10	,023

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estadística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	,684	1	18	,419
		Com base em mediana	,082	1	18	,778
		Com base em mediana e com df ajustado	,082	1	16,751	,779
		Com base em média aparada	,425	1	18	,523
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,485	1	18	,495
		Com base em mediana	,171	1	18	,684
		Com base em mediana e com df ajustado	,171	1	17,673	,684
		Com base em média aparada	,458	1	18	,507
T0_T3	Nitrato	Com base em média	1,368	1	18	,257
		Com base em mediana	,288	1	18	,598
		Com base em mediana e com df ajustado	,288	1	16,085	,599
		Com base em média aparada	1,357	1	18	,259
T1_T2	Nitrato	Com base em média	10,026	1	18	,005
		Com base em mediana	4,643	1	18	,045
		Com base em mediana e com df ajustado	4,643	1	12,315	,052
		Com base em média aparada	9,200	1	18	,007
T2_T3	Nitrato	Com base em média	,365	1	18	,553
		Com base em mediana	,095	1	18	,761
		Com base em mediana e com df ajustado	,095	1	17,975	,761
		Com base em média aparada	,341	1	18	,567

## SISTEMA AnF1A e AnF1B

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	AnF1A	,209	10	,200*	,869	10	,097
		AnF1B	,189	10	,200*	,873	10	,108
T0_T2	Amônia	AnF1A	,105	10	,200*	,967	10	,857
		AnF1B	,230	10	,143	,827	10	,031
T0_T3	Amônia	AnF1A	,209	10	,200*	,902	10	,228
		AnF1B	,274	10	,032	,827	10	,031
T1_T2	Amônia	AnF1A	,205	10	,200*	,890	10	,170
		AnF1B	,236	10	,121	,861	10	,078
T2_T3	Amônia	AnF1A	,317	10	,005	,826	10	,030
		AnF1B	,170	10	,200*	,878	10	,122

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	1,899	1	18	,185
		Com base em mediana	1,894	1	18	,186
		Com base em mediana e com df ajustado	1,894	1	17,923	,186
		Com base em média aparada	1,895	1	18	,186
T0_T2	Amônia	Com base em média	,609	1	18	,445
		Com base em mediana	,162	1	18	,692
		Com base em mediana e com df ajustado	,162	1	17,944	,692
		Com base em média aparada	,583	1	18	,455
T0_T3	Amônia	Com base em média	,005	1	18	,943
		Com base em mediana	,091	1	18	,766
		Com base em mediana e com df ajustado	,091	1	17,509	,766
		Com base em média aparada	,005	1	18	,942
T1_T2	Amônia	Com base em média	,584	1	18	,455
		Com base em mediana	,308	1	18	,586
		Com base em mediana e com df ajustado	,308	1	17,923	,586
		Com base em média aparada	,638	1	18	,435
T2_T3	Amônia	Com base em média	26,735	1	18	,000
		Com base em mediana	3,815	1	18	,067
		Com base em mediana e com df ajustado	3,815	1	10,277	,079
		Com base em média aparada	24,459	1	18	,000

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	AnF1A	,359	10	,001	,735	10	,002
		AnF1B	,299	10	,012	,740	10	,003
T0_T2	Nitrito	AnF1A	,163	10	,200*	,909	10	,276
		AnF1B	,312	10	,007	,787	10	,010
T0_T3	Nitrito	AnF1A	,297	10	,012	,804	10	,016
		AnF1B	,234	10	,129	,867	10	,092
T1_T2	Nitrito	AnF1A	,353	10	,001	,743	10	,003
		AnF1B	,378	10	,000	,679	10	,000
T2_T3	Nitrito	AnF1A	,253	10	,068	,813	10	,021
		AnF1B	,245	10	,090	,823	10	,028

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	,119	1	18	,734
		Com base em mediana	,014	1	18	,908
		Com base em mediana e com df ajustado	,014	1	17,936	,908
		Com base em média aparada	,128	1	18	,725
T0_T2	Nitrito	Com base em média	1,852	1	18	,190
		Com base em mediana	,243	1	18	,628
		Com base em mediana e com df ajustado	,243	1	12,337	,630
		Com base em média aparada	1,626	1	18	,219
T0_T3	Nitrito	Com base em média	5,703	1	18	,028
		Com base em mediana	3,984	1	18	,061
		Com base em mediana e com df ajustado	3,984	1	17,962	,061
		Com base em média aparada	5,860	1	18	,026
T1_T2	Nitrito	Com base em média	11,889	1	18	,003
		Com base em mediana	1,839	1	18	,192
		Com base em mediana e com df ajustado	1,839	1	12,256	,199
		Com base em média aparada	10,668	1	18	,004
T2_T3	Nitrito	Com base em média	,002	1	18	,969
		Com base em mediana	,008	1	18	,931
		Com base em mediana e com df ajustado	,008	1	17,971	,931
		Com base em média aparada	,002	1	18	,963

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	AnF1A	,337	10	,002	,749	10	,003
		AnF1B	,430	10	,000	,563	10	,000
T0_T2	Nitrato	AnF1A	,241	10	,105	,806	10	,017
		AnF1B	,418	10	,000	,573	10	,000
T0_T3	Nitrato	AnF1A	,311	10	,007	,735	10	,002
		AnF1B	,262	10	,051	,771	10	,006
T1_T2	Nitrato	AnF1A	,205	10	,200*	,860	10	,076
		AnF1B	,303	10	,010	,742	10	,003
T2_T3	Nitrato	AnF1A	,409	10	,000	,624	10	,000
		AnF1B	,383	10	,000	,665	10	,000

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	,664	1	18	,426
		Com base em mediana	,433	1	18	,519
		Com base em mediana e com df ajustado	,433	1	17,717	,519
		Com base em média aparada	,846	1	18	,370
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,007	1	18	,932
		Com base em mediana	,175	1	18	,681
		Com base em mediana e com df ajustado	,175	1	13,462	,682
		Com base em média aparada	,011	1	18	,916
T0_T3	Nitrato	Com base em média	,047	1	18	,831
		Com base em mediana	,005	1	18	,947
		Com base em mediana e com df ajustado	,005	1	17,808	,947
		Com base em média aparada	,061	1	18	,808
T1_T2	Nitrato	Com base em média	6,716	1	18	,018
		Com base em mediana	6,585	1	18	,019
		Com base em mediana e com df ajustado	6,585	1	12,242	,024
		Com base em média aparada	6,522	1	18	,020
T2_T3	Nitrato	Com base em média	,695	1	18	,415
		Com base em mediana	,141	1	18	,711
		Com base em mediana e com df ajustado	,141	1	16,592	,712
		Com base em média aparada	,505	1	18	,486

## Sistemas FaF1A e FaF1B

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	FaF1A	,183	10	,200*	,914	10	,311
		FaF1B	,210	10	,200*	,864	10	,084
T0_T2	Amônia	FaF1A	,176	10	,200*	,925	10	,404
		FaF1B	,202	10	,200*	,876	10	,117
T0_T3	Amônia	FaF1A	,208	10	,200*	,862	10	,080
		FaF1B	,211	10	,200*	,866	10	,090
T1_T2	Amônia	FaF1A	,241	10	,103	,839	10	,043
		FaF1B	,193	10	,200*	,873	10	,109
T2_T3	Amônia	FaF1A	,145	10	,200*	,928	10	,432
		FaF1B	,168	10	,200*	,938	10	,531

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	,713	1	18	,410
		Com base em mediana	,456	1	18	,508
		Com base em mediana e com df ajustado	,456	1	17,699	,508
		Com base em média aparada	,703	1	18	,413
T0_T2	Amônia	Com base em média	,064	1	18	,804
		Com base em mediana	,035	1	18	,854
		Com base em mediana e com df ajustado	,035	1	14,602	,855
		Com base em média aparada	,068	1	18	,797
T0_T3	Amônia	Com base em média	,512	1	18	,483
		Com base em mediana	,230	1	18	,637
		Com base em mediana e com df ajustado	,230	1	12,404	,640
		Com base em média aparada	,445	1	18	,513
T1_T2	Amônia	Com base em média	,300	1	18	,591
		Com base em mediana	,029	1	18	,866
		Com base em mediana e com df ajustado	,029	1	17,970	,866
		Com base em média aparada	,274	1	18	,607
T2_T3	Amônia	Com base em média	6,819	1	18	,018
		Com base em mediana	5,572	1	18	,030
		Com base em mediana e com df ajustado	5,572	1	13,337	,034
		Com base em média aparada	6,675	1	18	,019

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	FaF1A	,314	10	,006	,758	10	,005
		FaF1B	,246	10	,086	,870	10	,100
T0_T2	Nitrito	FaF1A	,234	10	,128	,860	10	,077
		FaF1B	,296	10	,013	,769	10	,006
T0_T3	Nitrito	FaF1A	,310	10	,007	,729	10	,002
		FaF1B	,340	10	,002	,665	10	,000
T1_T2	Nitrito	FaF1A	,247	10	,084	,833	10	,037
		FaF1B	,297	10	,012	,770	10	,006
T2_T3	Nitrito	FaF1A	,208	10	,200*	,817	10	,023
		FaF1B	,207	10	,200*	,876	10	,116

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	4,959	1	18	,039
		Com base em mediana	1,151	1	18	,297
		Com base em mediana e com df ajustado	1,151	1	11,036	,306
		Com base em média aparada	4,453	1	18	,049
T0_T2	Nitrito	Com base em média	,513	1	18	,483
		Com base em mediana	,474	1	18	,500
		Com base em mediana e com df ajustado	,474	1	17,040	,500
		Com base em média aparada	,594	1	18	,451
T0_T3	Nitrito	Com base em média	,035	1	18	,853
		Com base em mediana	,000	1	18	,983
		Com base em mediana e com df ajustado	,000	1	17,515	,983
		Com base em média aparada	,014	1	18	,908
T1_T2	Nitrito	Com base em média	1,459	1	18	,243
		Com base em mediana	,334	1	18	,570
		Com base em mediana e com df ajustado	,334	1	15,317	,572
		Com base em média aparada	1,300	1	18	,269
T2_T3	Nitrito	Com base em média	9,350	1	18	,007
		Com base em mediana	6,666	1	18	,019
		Com base em mediana e com df ajustado	6,666	1	9,877	,028
		Com base em média aparada	8,654	1	18	,009

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	FaF1A	,422	10	,000	,573	10	,000
		FaF1B	,216	10	,200 <sup>*</sup>	,852	10	,062
T0_T2	Nitrato	FaF1A	,346	10	,001	,639	10	,000
		FaF1B	,289	10	,017	,793	10	,012
T0_T3	Nitrato	FaF1A	,243	10	,096	,808	10	,018
		FaF1B	,308	10	,008	,725	10	,002
T1_T2	Nitrato	FaF1A	,422	10	,000	,621	10	,000
		FaF1B	,357	10	,001	,705	10	,001
T2_T3	Nitrato	FaF1A	,436	10	,000	,578	10	,000
		FaF1B	,312	10	,007	,673	10	,000

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	5,532	1	18	,030
		Com base em mediana	,637	1	18	,435
		Com base em mediana e com df ajustado	,637	1	9,822	,444
		Com base em média aparada	3,810	1	18	,067
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,488	1	18	,494
		Com base em mediana	,297	1	18	,592
		Com base em mediana e com df ajustado	,297	1	16,938	,593
		Com base em média aparada	,631	1	18	,437
T0_T3	Nitrato	Com base em média	1,809	1	18	,195
		Com base em mediana	,143	1	18	,710
		Com base em mediana e com df ajustado	,143	1	16,184	,710
		Com base em média aparada	1,669	1	18	,213
T1_T2	Nitrato	Com base em média	111,919	1	18	,000
		Com base em mediana	5,535	1	18	,030
		Com base em mediana e com df ajustado	5,535	1	9,441	,042
		Com base em média aparada	91,358	1	18	,000
T2_T3	Nitrato	Com base em média	4,042	1	18	,060
		Com base em mediana	,567	1	18	,461
		Com base em mediana e com df ajustado	,567	1	12,470	,465
		Com base em média aparada	2,900	1	18	,106



## Sistema FaF2A e FaF2B

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	FaF2A	,208	10	,200*	,875	10	,113
		FaF2B	,181	10	,200*	,902	10	,229
T0_T2	Amônia	FaF2A	,290	10	,017	,773	10	,007
		FaF2B	,234	10	,130	,876	10	,117
T0_T3	Amônia	FaF2A	,199	10	,200*	,882	10	,139
		FaF2B	,168	10	,200*	,903	10	,235
T1_T2	Amônia	FaF2A	,252	10	,071	,886	10	,153
		FaF2B	,203	10	,200*	,868	10	,094
T2_T3	Amônia	FaF2A	,207	10	,200*	,846	10	,052
		FaF2B	,339	10	,002	,707	10	,001

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	2,653	1	18	,121
		Com base em mediana	2,671	1	18	,120
		Com base em mediana e com df ajustado	2,671	1	11,324	,130
		Com base em média aparada	2,658	1	18	,120
T0_T2	Amônia	Com base em média	1,839	1	18	,192
		Com base em mediana	,156	1	18	,697
		Com base em mediana e com df ajustado	,156	1	14,276	,698
		Com base em média aparada	1,703	1	18	,208
T0_T3	Amônia	Com base em média	,753	1	18	,397
		Com base em mediana	,458	1	18	,507
		Com base em mediana e com df ajustado	,458	1	14,780	,509
		Com base em média aparada	,696	1	18	,415
T1_T2	Amônia	Com base em média	4,616	1	18	,046
		Com base em mediana	2,375	1	18	,141
		Com base em mediana e com df ajustado	2,375	1	17,024	,142
		Com base em média aparada	4,357	1	18	,051
T2_T3	Amônia	Com base em média	1,248	1	18	,279
		Com base em mediana	,326	1	18	,575
		Com base em mediana e com df ajustado	,326	1	12,824	,578
		Com base em média aparada	,823	1	18	,376

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	FaF2A	,217	10	,200*	,850	10	,058
		FaF2B	,263	10	,049	,777	10	,008
T0_T2	Nitrito	FaF2A	,192	10	,200*	,872	10	,105
		FaF2B	,219	10	,190	,903	10	,234
T0_T3	Nitrito	FaF2A	,250	10	,076	,828	10	,032
		FaF2B	,304	10	,009	,782	10	,009
T1_T2	Nitrito	FaF2A	,211	10	,200*	,887	10	,156
		FaF2B	,283	10	,023	,846	10	,052
T2_T3	Nitrito	FaF2A	,262	10	,050	,847	10	,054
		FaF2B	,172	10	,200*	,912	10	,292

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	12,016	1	18	,003
		Com base em mediana	6,629	1	18	,019
		Com base em mediana e com df ajustado	6,629	1	14,031	,022
		Com base em média aparada	11,737	1	18	,003
T0_T2	Nitrito	Com base em média	3,175	1	18	,092
		Com base em mediana	1,890	1	18	,186
		Com base em mediana e com df ajustado	1,890	1	17,730	,186
		Com base em média aparada	3,077	1	18	,096
T0_T3	Nitrito	Com base em média	8,228	1	18	,010
		Com base em mediana	2,157	1	18	,159
		Com base em mediana e com df ajustado	2,157	1	17,243	,160
		Com base em média aparada	7,767	1	18	,012
T1_T2	Nitrito	Com base em média	,034	1	18	,855
		Com base em mediana	,008	1	18	,928
		Com base em mediana e com df ajustado	,008	1	15,863	,928
		Com base em média aparada	,034	1	18	,856
T2_T3	Nitrito	Com base em média	,589	1	18	,453
		Com base em mediana	,735	1	18	,402
		Com base em mediana e com df ajustado	,735	1	17,053	,403
		Com base em média aparada	,555	1	18	,466

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	FaF2A	,438	10	,000	,571	10	,000
		FaF2B	,368	10	,000	,722	10	,002
T0_T2	Nitrato	FaF2A	,431	10	,000	,625	10	,000
		FaF2B	,327	10	,003	,709	10	,001
T0_T3	Nitrato	FaF2A	,381	10	,000	,666	10	,000
		FaF2B	,298	10	,012	,762	10	,005
T1_T2	Nitrato	FaF2A	,390	10	,000	,705	10	,001
		FaF2B	,300	10	,011	,793	10	,012
T2_T3	Nitrato	FaF2A	,301	10	,011	,762	10	,005
		FaF2B	,357	10	,001	,756	10	,004

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	1,012	1	18	,328
		Com base em mediana	,081	1	18	,779
		Com base em mediana e com df ajustado	,081	1	15,231	,779
		Com base em média aparada	,699	1	18	,414
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,105	1	18	,749
		Com base em mediana	,005	1	18	,943
		Com base em mediana e com df ajustado	,005	1	17,566	,943
		Com base em média aparada	,077	1	18	,785
T0_T3	Nitrato	Com base em média	5,381	1	18	,032
		Com base em mediana	1,539	1	18	,231
		Com base em mediana e com df ajustado	1,539	1	17,439	,231
		Com base em média aparada	5,339	1	18	,033
T1_T2	Nitrato	Com base em média	,045	1	18	,834
		Com base em mediana	,265	1	18	,613
		Com base em mediana e com df ajustado	,265	1	17,938	,613
		Com base em média aparada	,072	1	18	,792
T2_T3	Nitrato	Com base em média	4,395	1	18	,050
		Com base em mediana	1,653	1	18	,215
		Com base em mediana e com df ajustado	1,653	1	11,207	,224
		Com base em média aparada	3,587	1	18	,074

## Sistema par UaF2A e UaF2B

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	UaF2B	,198	10	,200*	,855	10	,066
		UaF2A	,273	10	,033	,778	10	,008
T0_T2	Amônia	UaF2B	,234	10	,129	,866	10	,089
		UaF2A	,296	10	,013	,811	10	,020
T0_T3	Amônia	UaF2B	,241	10	,103	,856	10	,068
		UaF2A	,291	10	,016	,793	10	,012
T1_T2	Amônia	UaF2B	,218	10	,196	,862	10	,081
		UaF2A	,320	10	,005	,646	10	,000
T2_T3	Amônia	UaF2B	,244	10	,093	,877	10	,121
		UaF2A	,258	10	,058	,854	10	,065

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	1,049	1	18	,319
		Com base em mediana	,626	1	18	,439
		Com base em mediana e com df ajustado	,626	1	16,421	,440
		Com base em média aparada	1,055	1	18	,318
T0_T2	Amônia	Com base em média	,219	1	18	,645
		Com base em mediana	,007	1	18	,933
		Com base em mediana e com df ajustado	,007	1	15,820	,933
		Com base em média aparada	,162	1	18	,692
T0_T3	Amônia	Com base em média	1,675	1	18	,212
		Com base em mediana	,144	1	18	,708
		Com base em mediana e com df ajustado	,144	1	13,670	,710
		Com base em média aparada	1,478	1	18	,240
T1_T2	Amônia	Com base em média	,956	1	18	,341
		Com base em mediana	,081	1	18	,779
		Com base em mediana e com df ajustado	,081	1	11,210	,781
		Com base em média aparada	,591	1	18	,452
T2_T3	Amônia	Com base em média	,040	1	18	,843
		Com base em mediana	,000	1	18	,984
		Com base em mediana e com df ajustado	,000	1	17,580	,984
		Com base em média aparada	,047	1	18	,831

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	UaF2B	,343	10	,002	,775	10	,007
		UaF2A	,316	10	,005	,682	10	,001
T0_T2	Nitrito	UaF2B	,317	10	,005	,725	10	,002
		UaF2A	,372	10	,000	,696	10	,001
T0_T3	Nitrito	UaF2B	,361	10	,001	,734	10	,002
		UaF2A	,332	10	,003	,786	10	,010
T1_T2	Nitrito	UaF2B	,219	10	,191	,824	10	,028
		UaF2A	,364	10	,001	,729	10	,002
T2_T3	Nitrito	UaF2B	,189	10	,200*	,897	10	,201
		UaF2A	,269	10	,038	,806	10	,017

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	,330	1	18	,573
		Com base em mediana	,073	1	18	,790
		Com base em mediana e com df ajustado	,073	1	17,905	,790
		Com base em média aparada	,333	1	18	,571
T0_T2	Nitrito	Com base em média	5,542	1	18	,030
		Com base em mediana	,175	1	18	,681
		Com base em mediana e com df ajustado	,175	1	15,223	,682
		Com base em média aparada	4,456	1	18	,049
T0_T3	Nitrito	Com base em média	4,318	1	18	,052
		Com base em mediana	,618	1	18	,442
		Com base em mediana e com df ajustado	,618	1	15,977	,443
		Com base em média aparada	3,802	1	18	,067
T1_T2	Nitrito	Com base em média	9,737	1	18	,006
		Com base em mediana	1,031	1	18	,323
		Com base em mediana e com df ajustado	1,031	1	11,512	,331
		Com base em média aparada	8,524	1	18	,009
T2_T3	Nitrito	Com base em média	,186	1	18	,671
		Com base em mediana	,267	1	18	,612
		Com base em mediana e com df ajustado	,267	1	17,101	,612
		Com base em média aparada	,179	1	18	,678

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	UaF2B	,356	10	,001	,702	10	,001
		UaF2A	,325	10	,004	,794	10	,012
T0_T2	Nitrato	UaF2B	,210	10	,200*	,891	10	,172
		UaF2A	,408	10	,000	,642	10	,000
T0_T3	Nitrato	UaF2B	,334	10	,002	,714	10	,001
		UaF2A	,354	10	,001	,693	10	,001
T1_T2	Nitrato	UaF2B	,284	10	,022	,860	10	,076
		UaF2A	,386	10	,000	,665	10	,000
T2_T3	Nitrato	UaF2B	,315	10	,006	,833	10	,037
		UaF2A	,161	10	,200*	,882	10	,138

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	30,192	1	18	,000
		Com base em mediana	2,870	1	18	,108
		Com base em mediana e com df ajustado	2,870	1	11,831	,116
		Com base em média aparada	26,450	1	18	,000
T0_T2	Nitrato	Com base em média	2,826	1	18	,110
		Com base em mediana	2,113	1	18	,163
		Com base em mediana e com df ajustado	2,113	1	17,477	,164
		Com base em média aparada	2,896	1	18	,106
T0_T3	Nitrato	Com base em média	56,767	1	18	,000
		Com base em mediana	4,728	1	18	,043
		Com base em mediana e com df ajustado	4,728	1	10,747	,053
		Com base em média aparada	48,891	1	18	,000
T1_T2	Nitrato	Com base em média	,063	1	18	,804
		Com base em mediana	,042	1	18	,839
		Com base em mediana e com df ajustado	,042	1	17,289	,839
		Com base em média aparada	,016	1	18	,899
T2_T3	Nitrato	Com base em média	36,981	1	18	,000
		Com base em mediana	6,280	1	18	,022
		Com base em mediana e com df ajustado	6,280	1	9,108	,033
		Com base em média aparada	33,959	1	18	,000

## Sistemas par ChoA e ChoB

### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Amônia	ChoA	,266	10	,043	,860	10	,076
		ChoB	,282	10	,024	,841	10	,046
T0_T2	Amônia	ChoA	,205	10	,200*	,903	10	,238
		ChoB	,213	10	,200*	,875	10	,115
T0_T3	Amônia	ChoA	,224	10	,169	,823	10	,027
		ChoB	,262	10	,051	,810	10	,019
T1_T2	Amônia	ChoA	,279	10	,027	,816	10	,022
		ChoB	,168	10	,200*	,900	10	,217
T2_T3	Amônia	ChoA	,207	10	,200*	,872	10	,105
		ChoB	,211	10	,200*	,853	10	,064

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Amônia	Com base em média	1,658	1	18	,214
		Com base em mediana	,397	1	18	,536
		Com base em mediana e com df ajustado	,397	1	17,809	,537
		Com base em média aparada	1,662	1	18	,214
T0_T2	Amônia	Com base em média	2,744	1	18	,115
		Com base em mediana	1,516	1	18	,234
		Com base em mediana e com df ajustado	1,516	1	10,944	,244
		Com base em média aparada	2,580	1	18	,126
T0_T3	Amônia	Com base em média	,807	1	18	,381
		Com base em mediana	,182	1	18	,675
		Com base em mediana e com df ajustado	,182	1	13,044	,676
		Com base em média aparada	,695	1	18	,415
T1_T2	Amônia	Com base em média	9,725	1	18	,006
		Com base em mediana	9,172	1	18	,007
		Com base em mediana e com df ajustado	9,172	1	10,817	,012
		Com base em média aparada	9,445	1	18	,007
T2_T3	Amônia	Com base em média	,183	1	18	,674
		Com base em mediana	,306	1	18	,587
		Com base em mediana e com df ajustado	,306	1	17,929	,587
		Com base em média aparada	,200	1	18	,660

**Testes de Normalidade**

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrito	ChoA	,181	10	,200*	,921	10	,366
		ChoB	,234	10	,130	,891	10	,173
T0_T2	Nitrito	ChoA	,343	10	,002	,757	10	,004
		ChoB	,323	10	,004	,753	10	,004
T0_T3	Nitrito	ChoA	,299	10	,012	,799	10	,014
		ChoB	,262	10	,049	,803	10	,016
T1_T2	Nitrito	ChoA	,231	10	,139	,828	10	,032
		ChoB	,373	10	,000	,741	10	,003
T2_T3	Nitrito	ChoA	,211	10	,200*	,886	10	,154
		ChoB	,288	10	,019	,788	10	,010

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrito	Com base em média	3,242	1	18	,089
		Com base em mediana	3,139	1	18	,093
		Com base em mediana e com df ajustado	3,139	1	12,115	,102
		Com base em média aparada	3,344	1	18	,084
T0_T2	Nitrito	Com base em média	11,605	1	18	,003
		Com base em mediana	1,559	1	18	,228
		Com base em mediana e com df ajustado	1,559	1	12,769	,234
		Com base em média aparada	10,166	1	18	,005
T0_T3	Nitrito	Com base em média	4,754	1	18	,043
		Com base em mediana	1,229	1	18	,282
		Com base em mediana e com df ajustado	1,229	1	12,571	,288
		Com base em média aparada	4,349	1	18	,052
T1_T2	Nitrito	Com base em média	,345	1	18	,564
		Com base em mediana	,462	1	18	,505
		Com base em mediana e com df ajustado	,462	1	15,363	,507
		Com base em média aparada	,446	1	18	,513
T2_T3	Nitrito	Com base em média	3,385	1	18	,082
		Com base em mediana	2,672	1	18	,119
		Com base em mediana e com df ajustado	2,672	1	10,977	,130
		Com base em média aparada	3,096	1	18	,095



### Testes de Normalidade

Tempo	Lodo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
			Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
T0_T1	Nitrato	ChoA	,265	10	,045	,831	10	,035
		ChoB	,227	10	,153	,803	10	,016
T0_T2	Nitrato	ChoA	,336	10	,002	,748	10	,003
		ChoB	,209	10	,200*	,882	10	,138
T0_T3	Nitrato	ChoA	,265	10	,045	,785	10	,010
		ChoB	,211	10	,200*	,849	10	,057
T1_T2	Nitrato	ChoA	,357	10	,001	,746	10	,003
		ChoB	,349	10	,001	,746	10	,003
T2_T3	Nitrato	ChoA	,234	10	,127	,827	10	,031
		ChoB	,253	10	,068	,797	10	,013

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

### Teste de Homogeneidade de Variância

Tempo			Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
T0_T1	Nitrato	Com base em média	2,896	1	18	,106
		Com base em mediana	1,279	1	18	,273
		Com base em mediana e com df ajustado	1,279	1	13,385	,278
		Com base em média aparada	2,594	1	18	,125
T0_T2	Nitrato	Com base em média	,884	1	18	,359
		Com base em mediana	,009	1	18	,927
		Com base em mediana e com df ajustado	,009	1	13,564	,927
		Com base em média aparada	,812	1	18	,380
T0_T3	Nitrato	Com base em média	,069	1	18	,795
		Com base em mediana	,001	1	18	,972
		Com base em mediana e com df ajustado	,001	1	17,650	,972
		Com base em média aparada	,073	1	18	,790
T1_T2	Nitrato	Com base em média	,258	1	18	,617
		Com base em mediana	,026	1	18	,874
		Com base em mediana e com df ajustado	,026	1	17,999	,874
		Com base em média aparada	,242	1	18	,629
T2_T3	Nitrato	Com base em média	2,672	1	18	,119
		Com base em mediana	,906	1	18	,354
		Com base em mediana e com df ajustado	,906	1	11,089	,361
		Com base em média aparada	2,398	1	18	,139

## COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS A E B DURANTE A ETAPA 2

Os dados obtidos de conversão das formas nitrogenadas presentes na amostras, ao longo dos tempos de cada teste e também com o número do teste, que irá refletir numa variável tempo, visto que o teste sucessor ao anterior representa maior tempo que a biomassa encontra-se dentro do sistema e com isso maior aclimação e enriquecimento dos grupos de micro-organismos que melhor se desenvolveram dadas as condições estabelecidas, são considerados não paramétricos visto que não correspondem aos pressupostos de normalidade e homogeneidade. A não normalidade e homogeneidade dos dados eram esperados dado as características das informações coletadas, visto que a conversão das formas nitrogenadas dependiam das densidades dos grupos de micro-organismos presentes nos inóculos bem como das concentrações dos substratos limitantes e das concentrações de substâncias inibitórias a cada grupo de micro-organismos. Dessa maneira torna-se necessário a adoção de testes não paramétricos para interpretação dos resultados obtidos.

Comparação entre os sistemas A e B de cada inóculo da etapa 2 para verificar se os mesmos continuaram a agir como duplicatas na conversão dos compostos nitrogenados. Para tanto realizou-se testes de hipóteses, sendo  $H_0 = F(\text{Sistema A}) = F(\text{Sistema B})$ ;  $H_1 = F(\text{Sistema A}) \neq F(\text{Sistema B})$ ;

Nesse teste não existe uma previsão de qual sistema apresentou maior ou menor conversão, então considera-se apenas a igualdade e desigualdade entre os valores lidos de conversão para amônia, nitrito e nitrato, e portanto busca-se uma análise bilateral.

Para esse teste os sistemas foram considerados como variáveis dependentes, visto que as mesmas estavam sendo avaliadas para checar a igualdade ou não, ou seja considerou elas como emparelhadas, como se fossem provenientes de um único sistema.

**Nesse caso utilizou-se o teste dos postos com sinais de Wilcoxon.**

Nesse teste calcula-se a diferença entre as observações de cada amostra (teste e tempo) das duas variáveis dependentes, nesse caso sistema A e sistema B, e depois essas diferenças são transformadas em postos, mas o sinal da diferença (se positiva ou negativa) é atribuído a cada posto. Ao final separa-se os postos com sinais negativos e positivos, e obtém-se a soma dos postos com mesmos sinais. A estatística desse teste (T) é utilizar o menor dos dois valores obtidos na soma dos postos com sinais diferentes (que será o valor T).

A significância do teste é obtida com o cálculo da média  $\bar{T}$  e do erro padrão do teste ( $EP_T$ ) do teste para cálculo de Z, de acordo com as equações:

$$\bar{T} = \frac{n(n+1)}{4}$$

$$EP_T = \sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}}$$

$$Z = \frac{T - \bar{T}}{EP_T}$$

**1) Dessa maneira tem-se para as conversões de amônia para os sistema A e B:**

Para os sistemas com inóculo proveniente da Lago Paranoá de Brasília (Par), as reduções nas concentrações de amônia, ao longo dos perfis temporais de cada teste e ao longo do conjunto de teste, foram significativamente mais altos para o sistema denominado de ParA (Média = 0,300; Mediana = 0,232) do que para o sistema denominado de ParB (Média = 0,274; Mediana = 0,256), com T = 447,0 e Z = -1,839 p < 0,05. Dessa maneira, esses sistema A e B com relação à redução de amônia não podem ser utilizados como duplicatas.

A tabela XX, apresenta os resultados sintetizados com relação às conversões ocorridas nas formas nitrogenadas dos sistemas operados com o mesmo tipo de inóculo, com a finalidade de avaliar se os sistemas permaneciam como representantes de duplicatas. O teste aplicado foi o dos postos com sinais de Wilcoxon.

IONS (mM) Intervalo tempo		SISTEMAS TESTADOS					
		ParA e ParB	AnF1A e AnF1B	FaF1A e FaF1B	FaF2A e FaF2B	UaF2A e UaF2B	ChoA e ChoB
AMONIA	T0_T1 (0 a 24 horas)	Não	✓	Não	✓	✓	✓
	T1_T2 (24 a 48 horas)	✓	Não	Não	✓	✓	Não
	T0_T2 (0 a 48 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	Não
	T2_T3 (48 a 72 horas)	✓	Não	✓	✓	✓	✓
	T0_T3 (0 a 72 horas)	✓	Não	Não	✓	✓	Não

NITRITO	T0_T1 (0 a 24 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	T1_T2 (24 a 48 horas)	Não	Não	✓	Não	✓	✓
	T0_T2 (0 a 48 horas)	✓	Não	✓	✓	✓	Não
	T2_T3 (48 a 72 horas)	Não	✓	✓	✓	✓	✓
	T0_T3 (0 a 72 horas)	✓	Não	✓	✓	✓	✓
NITRATO	T0_T1 (0 a 24 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	T1_T2 (24 a 48 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	T0_T2 (0 a 48 horas)	✓	✓	✓	✓	✓	Não
	T2_T3 (48 a 72 horas)	Não	✓	✓	✓	✓	✓
	T0_T3 (0 a 72 horas)	✓	Não	Não	✓	✓	✓
	Desigualdades	4	7	4	1	0	5
	Julgamento se iguais				SIM	SIM	

Acrescentar comentários do Livro sobre organização dos sistemas biológicos

## APENDICE VI

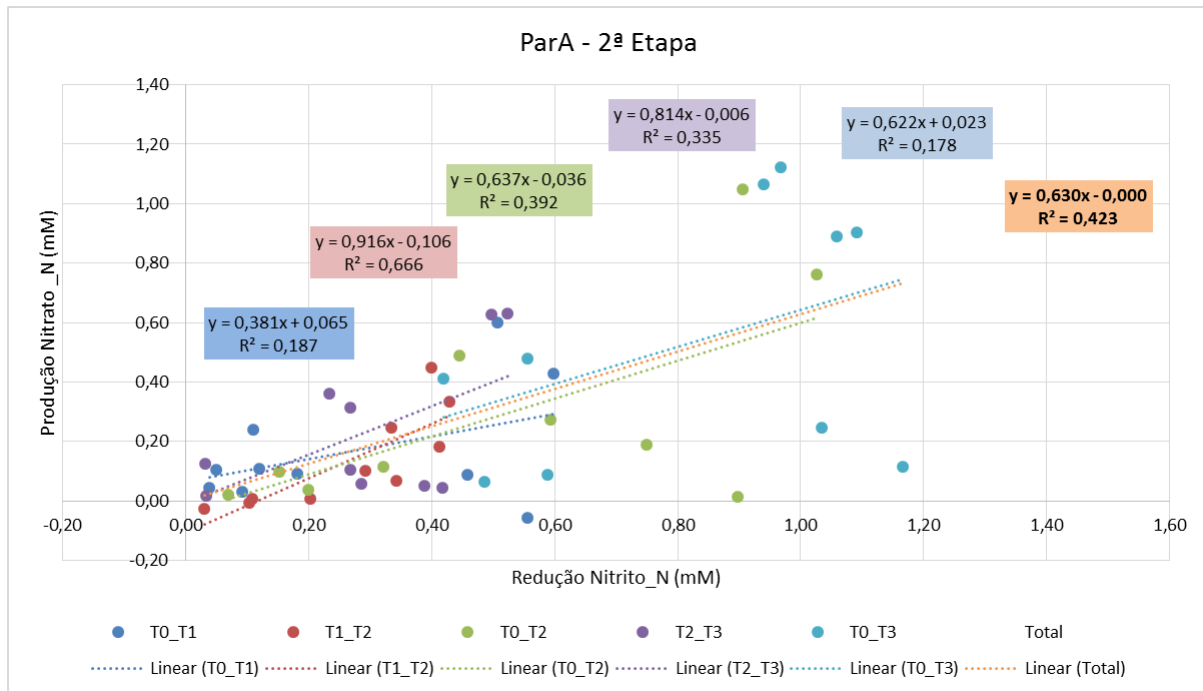


Figura VI.1: Correlações entre produção de nitrato<sub>N</sub> (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito<sub>N</sub> (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do sedimento do lago Paranoá Brasília, DF (ParA). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

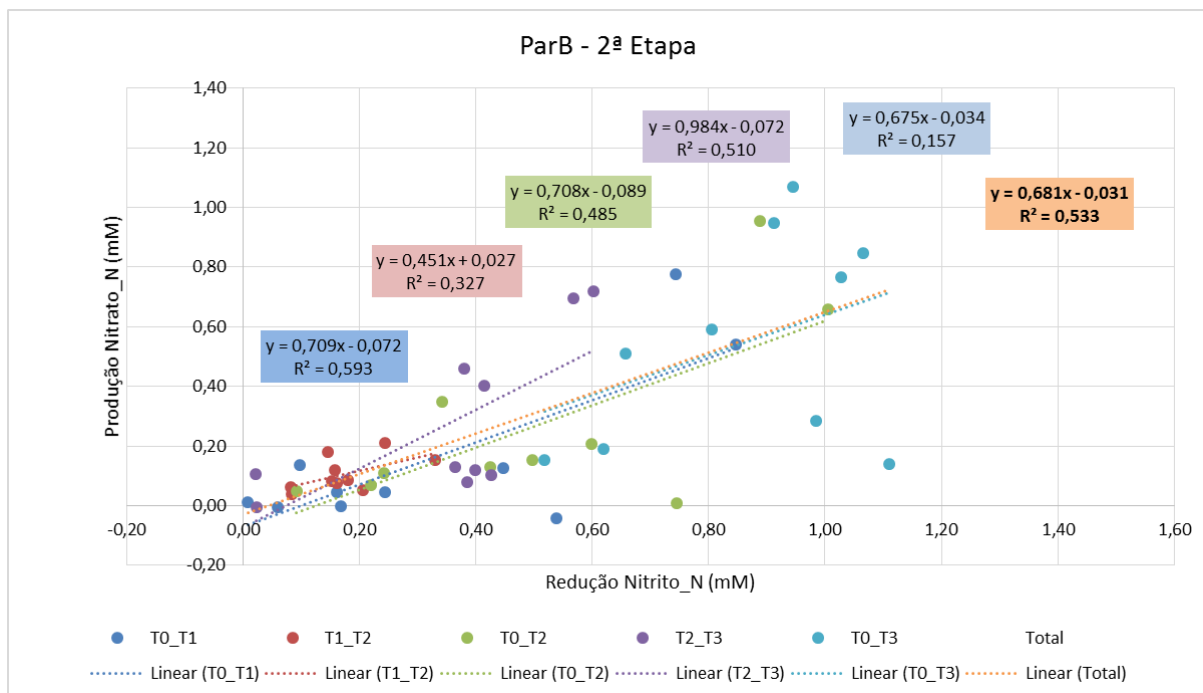


Figura VI.2: Correlações entre produção de nitrato<sub>N</sub> (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito<sub>N</sub> (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do sedimento do lago Paranoá Brasília, DF (ParB). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

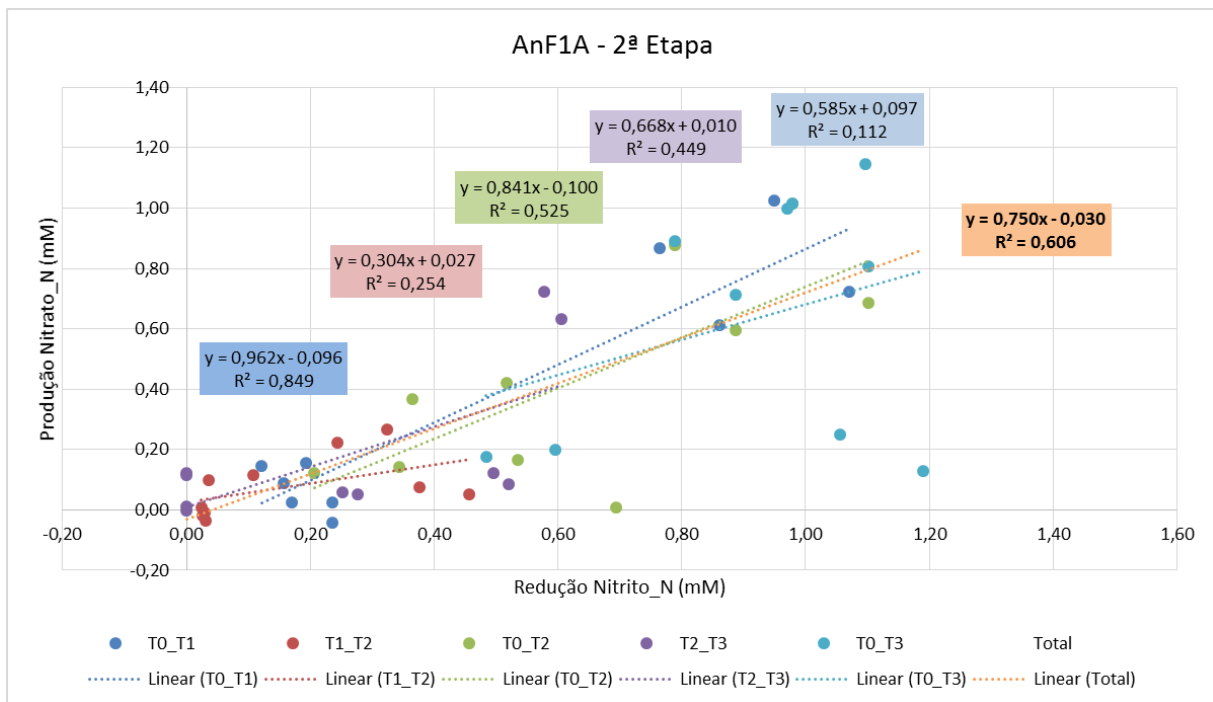


Figura VI.3: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari, MG (AnF1A). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

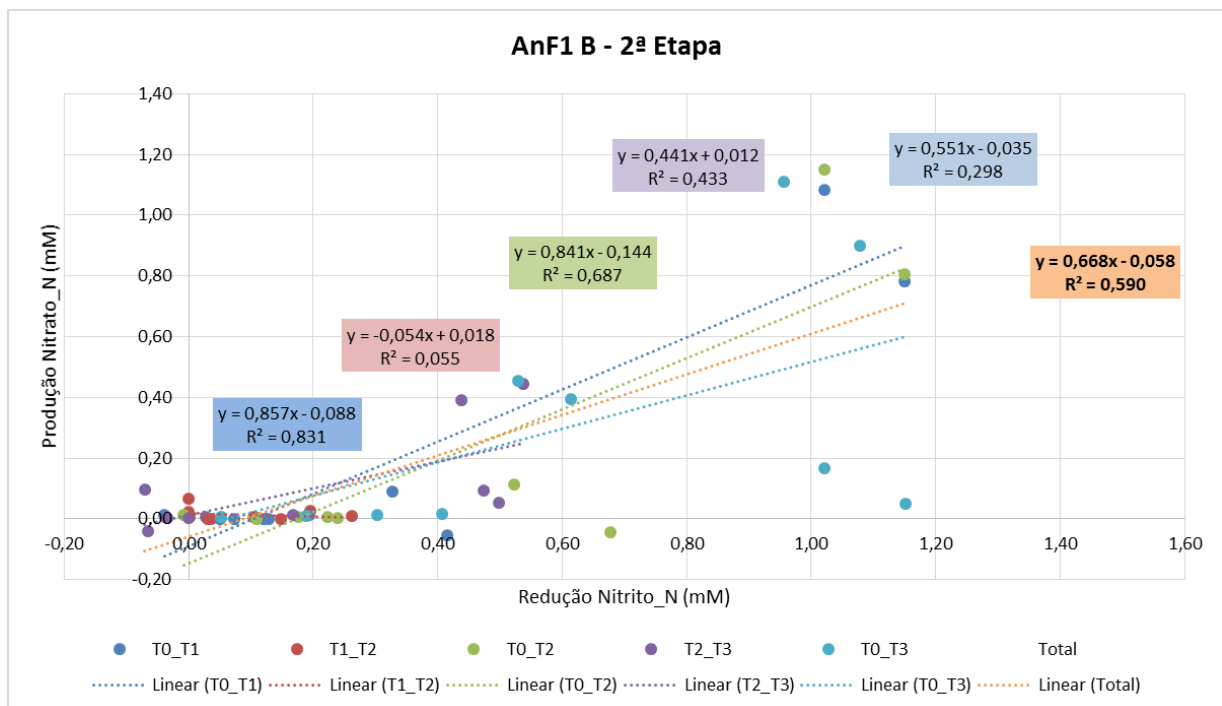


Figura VI.4: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari, MG (AnF1B). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

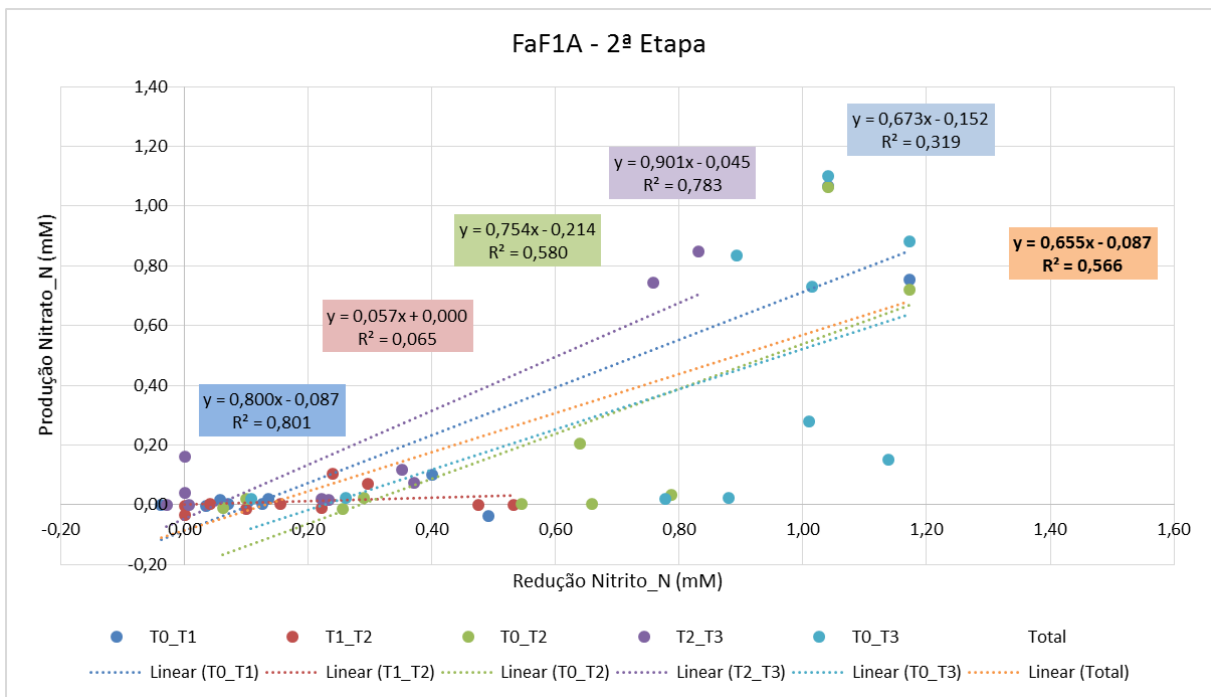


Figura VI.5: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari, MG (FaF1A). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

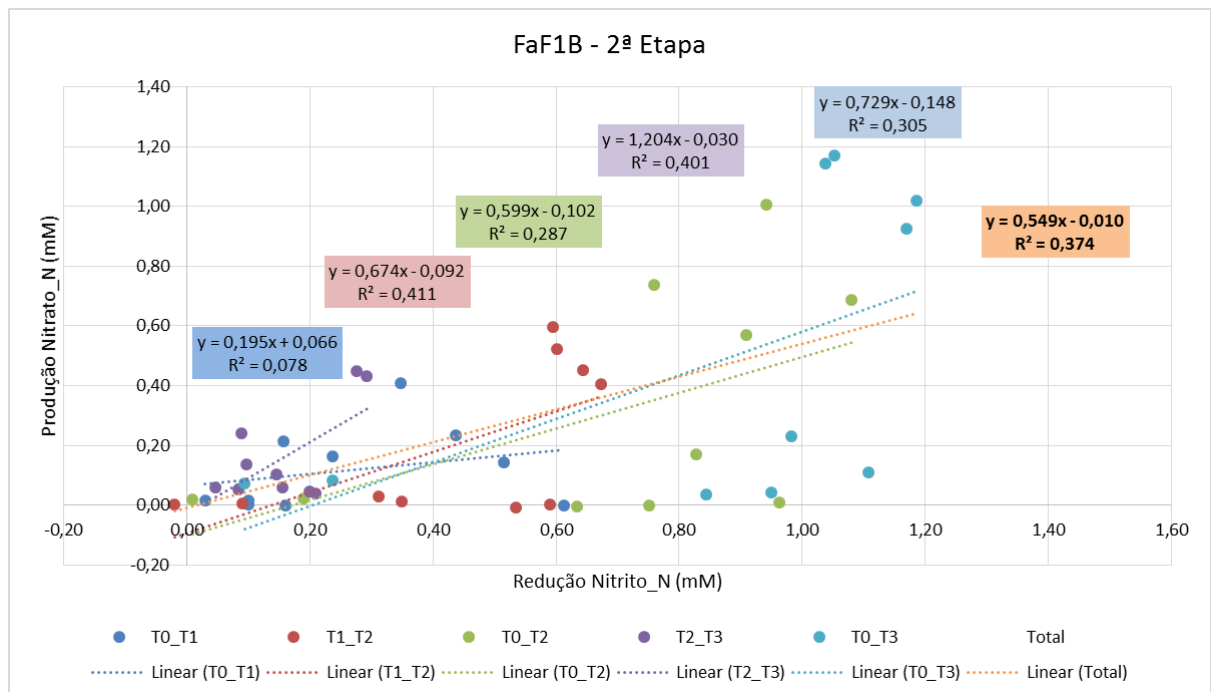


Figura VI.6: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari, MG (FaF1B). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

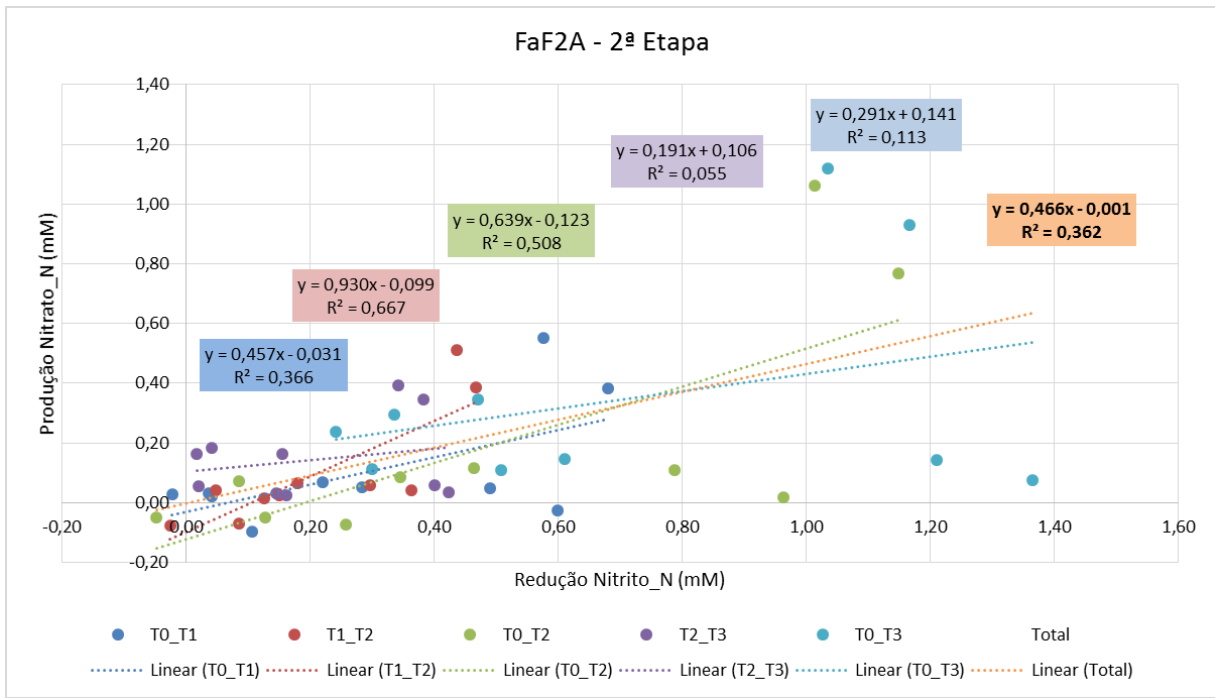


Figura VI.7: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG (FaF2A). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

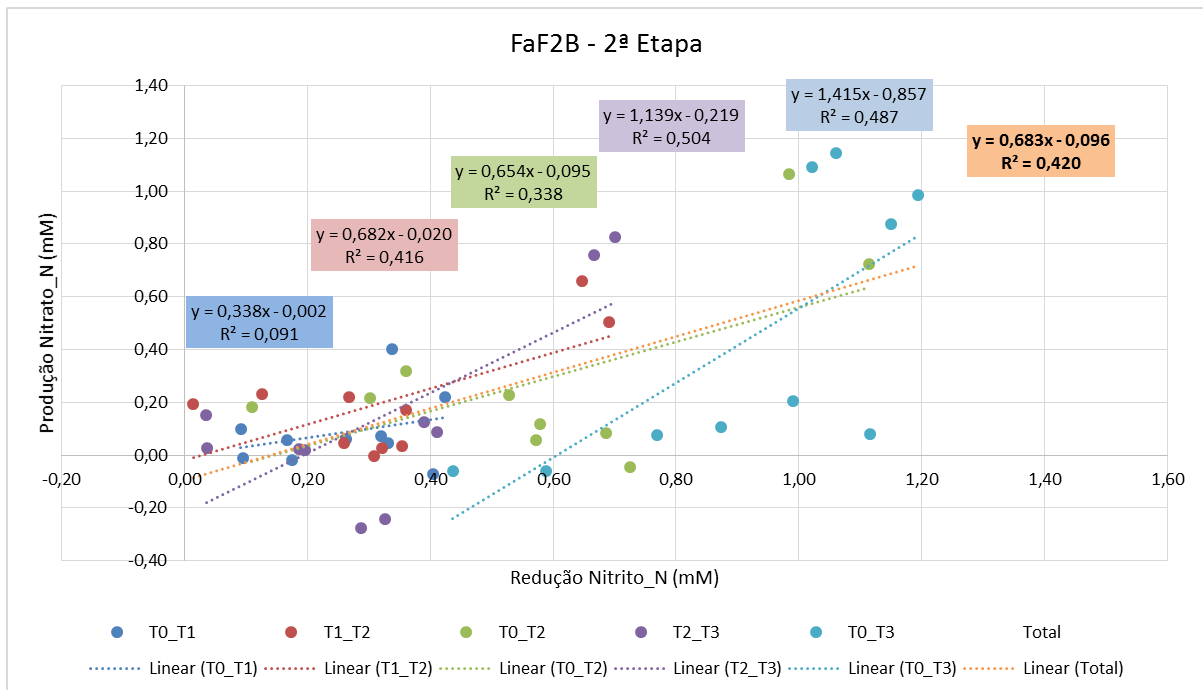


Figura VI.8: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG (FaF2B). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.



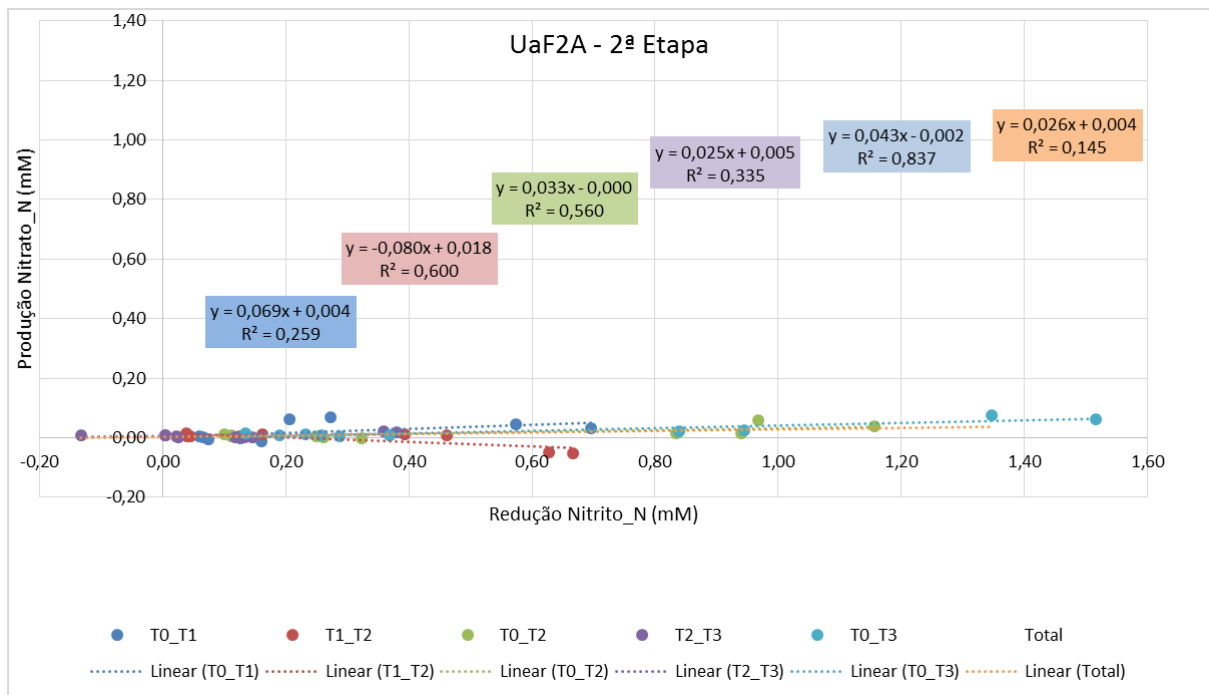


Figura VI.9: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do lodo do reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2A). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

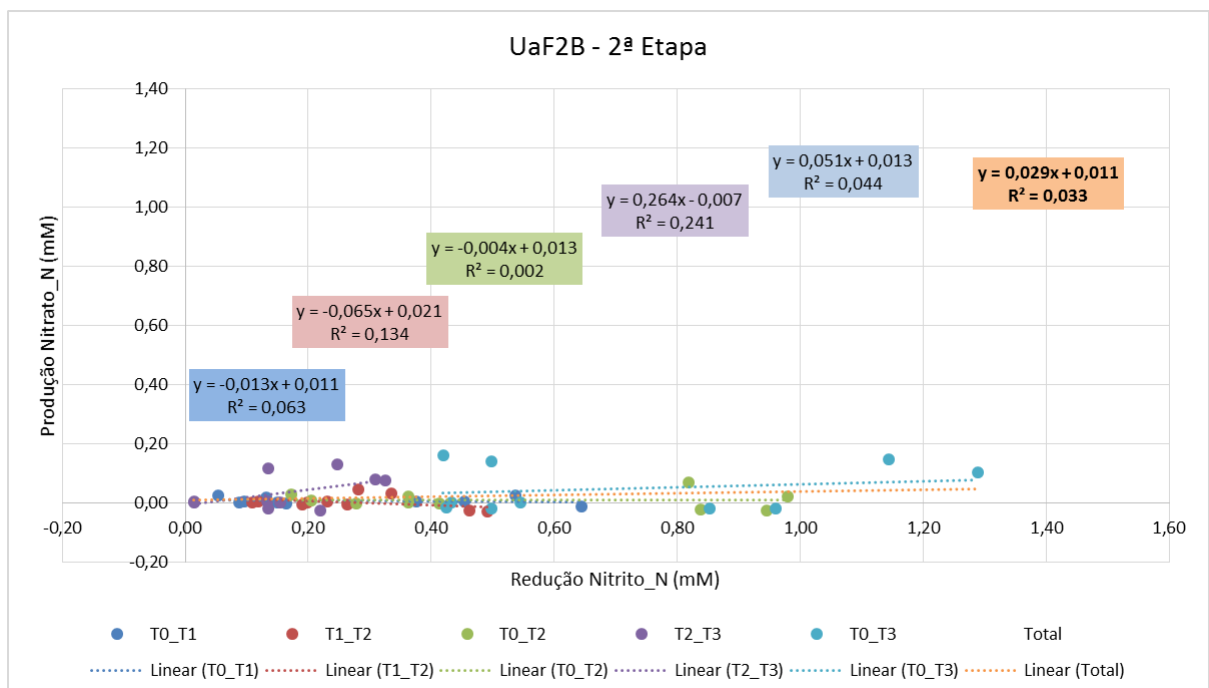


Figura VI.10: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do lodo do reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG (UaF2B). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

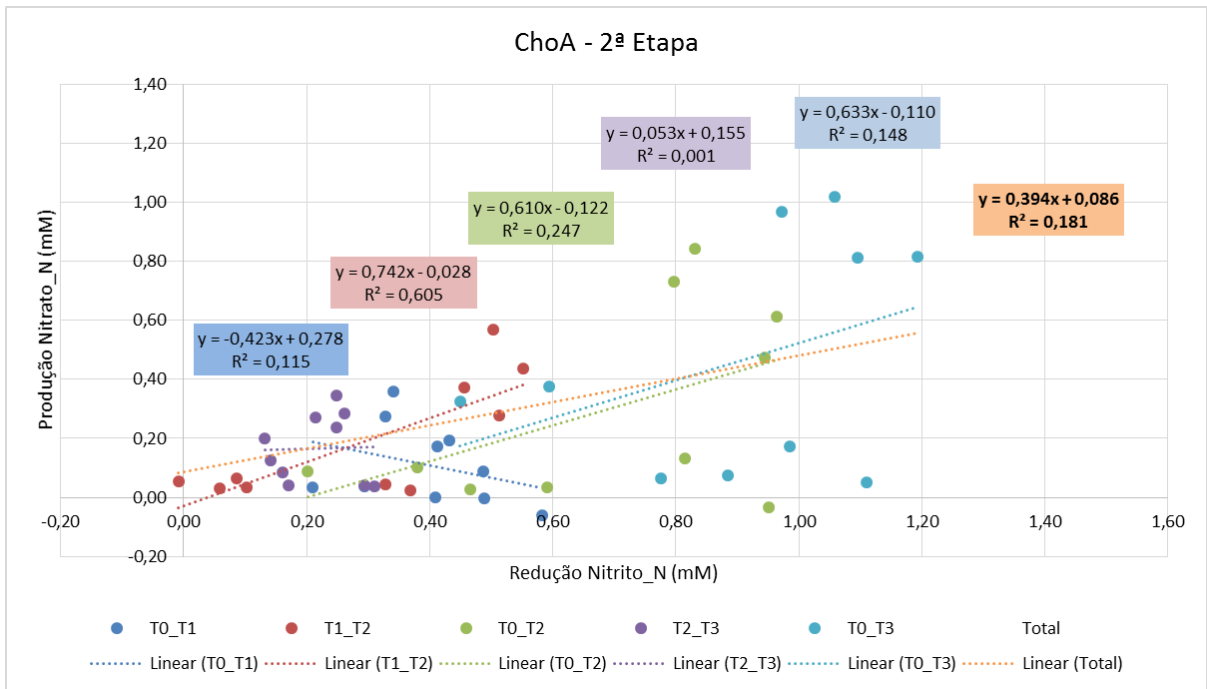


Figura VI.11: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília, DF (ChoA). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

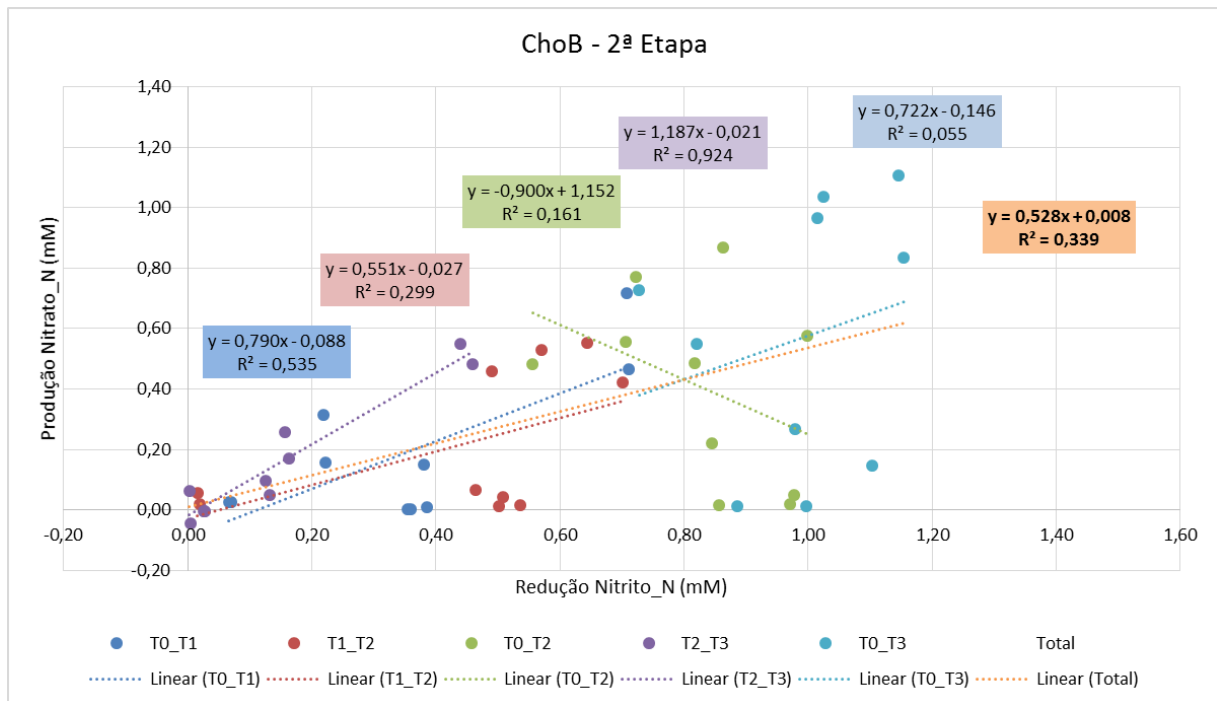


Figura VI.12: Correlações entre produção de nitrato\_N (mM) com a redução concomitante das concentrações de nitrito\_N (mM) no sistema biológico com inóculo proveniente do sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília, DF (ChoB). Cada equação representa a correlação para um dado intervalo de tempo. Na legenda, total - representa a correlação entre os dados de todos intervalos de tempo.

## APENDICE VII

### COMPARAÇÃO ENTRE LODOS 2ª ETAPA

Foi verificado a existência de diferença das relações T\_NiAm\_N e T\_Na\_NiAm\_N entre os diferentes sistemas componentes da etapa 2.

Verificou-se os valores calculados para essas variáveis quanto à sua distribuição normal e homogeneidade entre as variâncias entre os grupos comparados para definição dos testes de estatísticos afim de testar hipóteses do efeito da origem do inóculo em cada sistema sobre o comportamento metabólico ocorrentes nos sistemas biológicos.

Os dados calculados seguem uma distribuição livre e a variância das observações em torno da média entre os grupos comparados é heterogênea.

Diante desses resultados, optou-se pela realização do teste de Kruskal-Wallis que permite avaliar se há diferenças entre vários grupos independentes. O Teste de Kruskal-Wallis é uma alternativa a ANOVA independente de um fator, para quando os dados são não paramétricos.

O Teste de Kruskal-Wallis (H) tem como base os postos de valores. Inicia-se ordenando os escores do menor para o maior, ignorando o grupo ao qual o escore pertence. Após a ordenação, retorna-se os escores aos grupos aos quais eles pertenciam inicialmente e soma-se os postos atribuídos a cada escore para cada grupo. A soma dos postos de cada grupo é representada por  $R_i$  ( $i$  representa cada um dos grupos testados). A estatística H é calculada usando a equação:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N-1)$$

Onde:

$R_i$  = soma dos postos para cada grupo

$N$  = total da amostra (somatório de  $n_i$  de cada grupo testado)

$n_i$  = tamanho amostral de cada um dos grupos testados

$k$  = graus de liberdade (número de grupos menos um)

Essa estatística teste tem um tipo especial de distribuição conhecida como Qui-Quadrado e para isso essa distribuição possui um parâmetro denominado graus de liberdade, que é o número de grupos menos um (K-1).

Dessa maneira tem-se como resultados se os lodos diferem ou não quanto a relação de T\_NiAm\_N, para os intervalos de tempo do início de cada batelada (T0\_T1; T0\_T2; T0\_T3).

**Classificações<sup>a</sup>**

	Lodo	N	Postos de média	
T_NiAm_N	ParA	10	41,70	
	ParB	10	59,60	
	AnF1A	10	89,00	
	AnF1B	10	52,50	
	FaF1A	10	46,15	
	FaF1B	10	65,05	
	FaF2A	10	47,10	
	FaF2B	10	75,40	
	UaF2A	10	52,75	
	UaF2B	10	52,00	
	ChoA	10	73,70	
	ChoB	10	71,05	
	Total		120	

a. Tempo = T0\_T1

**Estatísticas de teste<sup>a,b,c</sup>**

		T_NiAm_N
Qui-quadrado		18,815
df		11
Significância Sig.		,065
Sig. Monte Carlo	Sig.	,057 <sup>d</sup>
	99% de Intervalo de Confiança	Limite inferior Limite superior
		,051 ,063

a. Tempo = T0\_T1

b. Teste Kruskal Wallis

c. Variável de Agrupamento: Lodo

d. Baseado em 10000 tabelas de amostra com o valor inicial 1502173562.

**Classificações<sup>a</sup>**

	Lodo	N	Postos de média
T_NiAm_N	ParA	10	50,60
	ParB	10	55,40
	AnF1A	10	86,50
	AnF1B	10	47,70
	FaF1A	10	42,15
	FaF1B	10	69,90
	FaF2A	10	41,40
	FaF2B	10	69,15
	UaF2A	10	44,20
	UaF2B	10	61,00
	ChoA	10	80,30
	ChoB	10	77,70
	Total	120	

a. Tempo = T0\_T2

**Estatísticas de teste<sup>a,b,c</sup>**

			T_NiAm_N
Qui-quadrado			22,995
df			11
Significância Sig.			,018
Sig. Monte Carlo	Sig.		,013 <sup>d</sup>
	99% de Intervalo de	Limite inferior	,010
	Confiança	Limite superior	,016

a. Tempo = T0\_T2

b. Teste Kruskal Wallis

c. Variável de Agrupamento: Lodo

d. Baseado em 10000 tabelas de amostra com o valor inicial 1502173562.

**Classificações<sup>a</sup>**

	Lodo	N	Postos de média
T_NiAm_N	ParA	10	63,10
	ParB	10	74,80
	AnF1A	10	75,10
	AnF1B	10	61,90
	FaF1A	10	37,30
	FaF1B	10	64,70
	FaF2A	10	55,00
	FaF2B	10	70,30
	UaF2A	10	36,30
	UaF2B	10	54,00
	ChoA	10	74,10
	ChoB	10	59,40
	Total		120

a. Tempo = T0\_T3

**Estatísticas de teste<sup>a,b,c</sup>**

			T_NiAm_N
Qui-quadrado			15,889
df			11
Significância Sig.			,145
Sig. Monte Carlo	Sig.		,139 <sup>d</sup>
	99% de Intervalo de	Limite inferior	,130
	Confiança	Limite superior	,148

a. Tempo = T0\_T3

b. Teste Kruskal Wallis

c. Variável de Agrupamento: Lodo

d. Baseado em 10000 tabelas de amostra com o valor inicial 1502173562.

As análises *post hoc* para o teste de Kruskal-wallis, que busca quais os sistema que foram responsáveis pela diferença entre as relações nos tempos testados, não foram realizadas pois a opção seriam os testes de Mann-Witney que faz comparação em pares e com tal tratamento estatísticos, visto que são 12 sistemas a serem comparados em duplas, aumentaria a possibilidade de incorrer no erro tipo I (quando aceita um efeito que na verdade não existe). Para reduzir as chances de cometer o erro tipo I, deve-se aplicar a correção de Bonferroni que divide o valor crítico de significância de 0,05 pelo número de comparações a serem feitas. Na situação em estudo equivaleria a serem

realizadas 132 comparações, que para serem significativamente diferentes teriam que apresentar  $p < 3,788 \times 10^{-4}$ . Outra opção de teste post hoc tem semelhanças com o de Mann-Witney, por fazer comparações entre duplas da fator de grupo em estudo, no entanto envolve tomar a diferença entre as médias dos postos dos diferentes grupos comparadas com um valor Z (corrigido pelo número de comparações sendo feitas) e uma constante baseada no tamanho amostral total e as dos tamanhos amostras dos dois grupos sendo comparados, dada pela equação:

$$|\bar{R}_u - \bar{R}_v| \geq Z_{\alpha/k(k-1)} \sqrt{\frac{N(N-1)}{12} \left( \frac{1}{n_u} + \frac{1}{n_v} \right)}$$

Onde:

$|\bar{R}_u - \bar{R}_v|$  = diferença em módulos entre a média dos postos para os dois grupos comparados

k = número de grupos

N = tamanho total da amostra

$n_u$  = tamanho da amostra no grupo 1

$n_v$  = tamanho da amostra no grupo 2

$Z_{\alpha/k(k-1)}$  = valor da curva normal para o qual somente  $\alpha/k(k-1)$ , dos demais valores

Z são maiores.

Dessa maneira tem-se como resultados se os lodos diferem ou não quanto a relação de T\_Na\_NiAm\_N, para os intervalos de tempo do início de cada batelada (T0\_T1; T0\_T2; T0\_T3).

**Classificações<sup>a</sup>**

	Lodo	N	Postos de média	
T_Na_NiAm_N	ParA	10	76,90	
	ParB	10	75,55	
	AnF1A	10	88,00	
	AnF1B	10	48,50	
	FaF1A	10	48,90	
	FaF1B	10	67,05	
	FaF2A	10	65,90	
	FaF2B	10	64,10	
	UaF2A	10	31,40	
	UaF2B	10	28,75	
	ChoA	10	60,00	
	ChoB	10	70,95	
	Total		120	

a. Tempo = T0\_T1

**Estatísticas de teste<sup>a,b,c</sup>**

		T_Na_NiAm_N
Qui-quadrado		29,586
df		11
Significância Sig.		,002
Sig. Monte Carlo	Sig.	,001 <sup>d</sup>
99% de Intervalo de Confiança		
	Limite inferior	,000
	Limite superior	,001

a. Tempo = T0\_T1

b. Teste Kruskal Wallis

c. Variável de Agrupamento: Lodo

d. Baseado em 10000 tabelas de amostra com o valor inicial 112562564.



**Classificações<sup>a</sup>**

	Lodo	N	Postos de média	
T_Na_NiAm_N	ParA	10	74,00	
	ParB	10	78,00	
	AnF1A	10	91,25	
	AnF1B	10	49,85	
	FaF1A	10	43,25	
	FaF1B	10	66,20	
	FaF2A	10	54,00	
	FaF2B	10	76,30	
	UaF2A	10	25,85	
	UaF2B	10	21,55	
	ChoA	10	72,10	
	ChoB	10	73,65	
	Total		120	

a. Tempo = T0\_T2

**Estatísticas de teste<sup>a,b,c</sup>**

			T_Na_NiAm_N
Qui-quadrado			42,933
df			11
Significância Sig.			,000
Sig. Monte Carlo	Sig.		,000 <sup>d</sup>
	99% de Intervalo de	Limite inferior	,000
	Confiança	Limite superior	,000

a. Tempo = T0\_T2

b. Teste Kruskal Wallis

c. Variável de Agrupamento: Lodo

d. Baseado em 10000 tabelas de amostra com o valor inicial 112562564.

**Classificações<sup>a</sup>**

	Lodo	N	Postos de média
T_Na_NiAm_N	ParA	10	76,80
	ParB	10	77,80
	AnF1A	10	84,05
	AnF1B	10	54,55
	FaF1A	10	53,75
	FaF1B	10	72,25
	FaF2A	10	65,80
	FaF2B	10	62,70
	UaF2A	10	20,90
	UaF2B	10	23,10
	ChoA	10	69,25
	ChoB	10	65,05
	Total	120	

a. Tempo = T0\_T3

**Estatísticas de teste<sup>a,b,c</sup>**

		T_Na_NiAm_N
Qui-quadrado		36,662
df		11
Significância Sig.		,000
Sig. Monte Carlo	Sig.	,000 <sup>d</sup>
	99% de Intervalo de Confiança	
	Limite inferior	,000
	Limite superior	,000

a. Tempo = T0\_T3

b. Teste Kruskal Wallis

c. Variável de Agrupamento: Lodo

d. Baseado em 10000 tabelas de amostra com o valor inicial 112562564.

Exemplo de como relatar esses resultados:

A relação T\_Na\_NiAm\_N foi significativamente afetada pelo tipo de inóculo nos sistemas testados comparando-se o início das bateladas até 72 horas (T0\_T1) sendo (H 11) = 36,662, p< 0,001.

Preciso relatar o tamanho do efeito, pois não fiz os testes *pos hoc*.

---

## APENDICE VIII

Análise de PCR e avaliação do sucesso de extração de DNA e das ampliações em eletroforeses em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para os sistemas biológicos após 120 de operação visando o enriquecimento dos micro-organismos anammox.

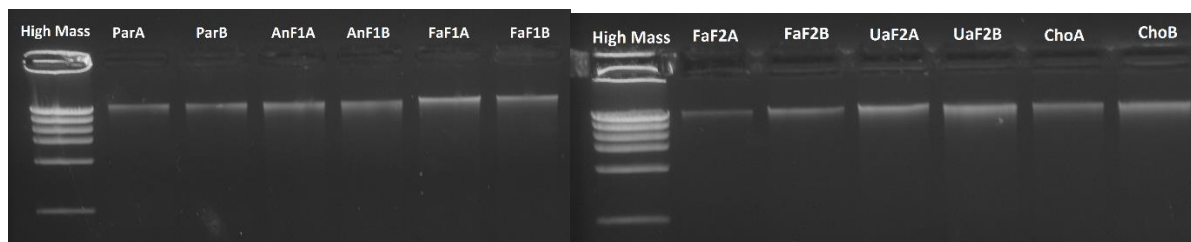


Figura VIII.1: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para avaliação do DNA genômico extraído das biomassas nos sistemas biológicos após 180 dias para ocorrência de enriquecimento e atividade anammox em culturas bateladas. **ParA e ParB**: com inóculo proveniente do sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1A e AnF1B**: com inóculo proveniente do lodo de lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1A e FaF1B**: com inóculo proveniente do lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 3, Araguari/MG; **FaF2A e FaF2B**: com inóculo proveniente do lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2A e UaF2B**: com inóculo proveniente do lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **ChoA e ChoB**: com inóculo proveniente do lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília/DF.

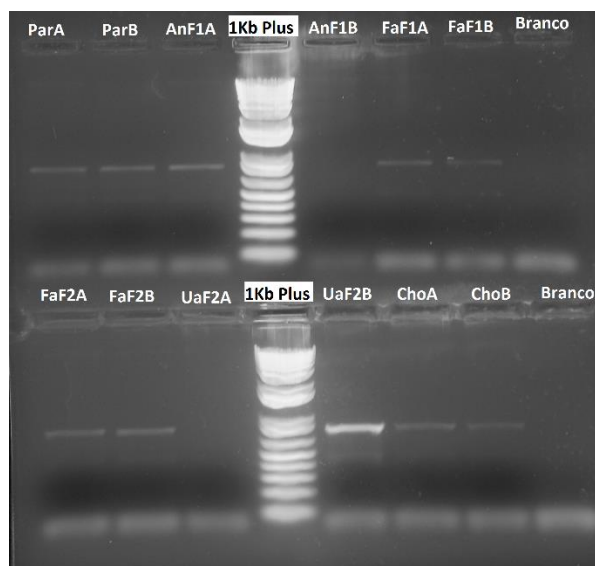


Figura VIII.2: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para avaliação dos fragmentos amplificados de 774 pb a partir das biomassas dos sistemas biológicos após 180 dias para enriquecimento e atividade anammox em culturas bateladas com os pares de primers Pla 46F e Amx 820R. **ParA e ParB**: sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1A e AnF1B**: lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1A e FaF1B**: lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2A e FaF2B**: lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2A e UaF2B**: lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **ChoA e ChoB**: lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube de Brasília/DF.

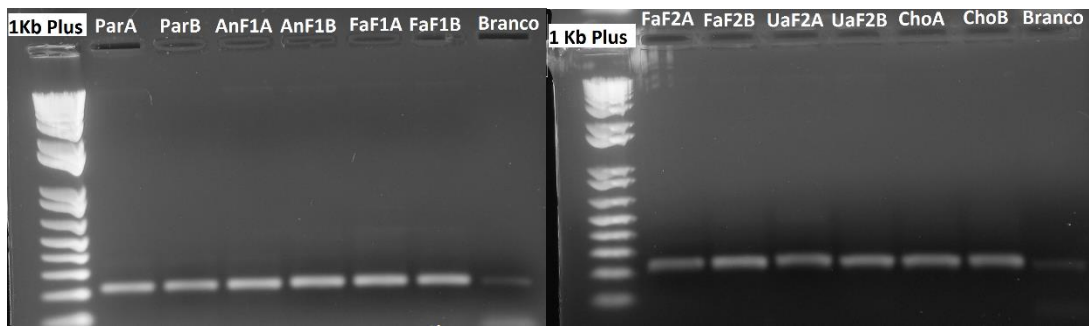


Figura VIII.3: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ( $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) para avaliação dos fragmentos amplificados de 225 pb, a partir dos inóculos testados nos experimentos em bateladas para atividade anammox após 180 dias, com os pares de *primers* Nitro 1198Fe Nitro 1423R para micro-organismos como *Nitrobacter*. **Legenda:** **ParA e ParB:** sedimento do lago Paranoá, Brasília/DF; **AnF1A e AnF1B:** lodo da lagoa anaeróbia tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF1A e FaF2B:** lodo da lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 1, Araguari/MG; **FaF2A e FaF2B:** lodo de lagoa facultativa tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia, MG; **UaF2A e UaF2B:** lodo de reator UASB tratando efluente do Frigorífico 2, Uberlândia/MG; **ChoA e ChoB:** sedimento da lagoa de acumulação de chorume do aterro controlado Jockey Clube, Brasília, DF.